



**UNIVERSITE DE LIEGE
FACULTE DE MEDECINE VETERINAIRE
DEPARTEMENT DES SCIENCES FONCTIONNELLES
SERVICE DE PHYSIOLOGIE
LABORATOIRE D'IMMUNOPHYSIOLOGIE**

**Etude du rôle des neutrophiles et des « Neutrophil Extracellular Traps »
dans l'induction de l'asthme allergique**

**Study of the role of neutrophils and “Neutrophil Extracellular Traps” in
allergic asthma onset**

Radermecker Coraline

**THESE PRESENTEE EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE
Docteur en Sciences Vétérinaires**

ANNEE ACADEMIQUE 2019-2020

Remerciements

S'il est vrai que ces 8 années de thèse m'ont permis d'approfondir le domaine de l'immunologie, d'acquérir des compétences et des connaissances scientifiques et de me former au métier de chercheur, elles sont heureusement loin de se limiter à ces aspects « techniques » et ont constitué une fameuse aventure humaine. Car, en 8 ans, j'en ai rencontrées des personnes formidables, sans qui cette longue et parfois périlleuse expérience n'aurait certainement pas été aussi enrichissante. Je tiens à tous vous remercier du fond du cœur, d'avoir croisé ou réalisé une partie du chemin à mes côtés et d'avoir fait de cette thèse une super expérience.

Je tiens à remercier tout d'abord mon promoteur, le professeur Thomas Marichal. Tu es le premier à m'avoir parlé en long et en large du métier de chercheur, le lendemain de ta défense privée je pense, avec l'enthousiasme qui te caractérise. C'est ensuite grâce à toi, à ton retour de post-doc, et à un de tes mails « Et quoi les gars, tous les avions de la Malaysian airlines ne se crachent pas, allez-y ! » que j'ai pu vivre une des plus chouettes expériences de ma thèse, la winter school à Singapour. Tu m'as ensuite prise sous ton aile à un moment où ma thèse s'enlisait sérieusement. Tu m'as aidée à aller de l'avant, à prendre confiance en moi et à me surpasser. Depuis, tu m'as permis d'en vivre de belles expériences, de dépasser mon manque de confiance en moi et d'aller parler presque aux quatre coins du monde de mon super projet. Si aujourd'hui je peux regarder en arrière et être super fière du travail qu'on a réalisé et du chemin parcouru, c'est en grande partie grâce à toi. Merci pour ton inébranlable optimisme, pour ton écoute (même dans des moments plus très cohérents.....), ton soutien, ta patience parfois, ta motivation et ta confiance. Travailler avec toi est une chance et un réel plaisir, merci, merci.

La deuxième personne à laquelle je pense lorsqu'il s'agit de remerciements, est, évidemment, mon premier promoteur et actuel co-promoteur, le professeur Fabrice Bureau. Merci Fabrice de m'avoir fait très peur un matin de TP biochimie où j'ai été convoquée dans ton bureau car tu devais nous parler, à Mickael et à moi. Il faut croire que tu nous a fortement impressionnés car nous avons tout les deux fini par réaliser une thèse, Mickael chez Laurent et moi, chez toi. Merci de m'avoir donné l'opportunité de découvrir le monde de la recherche. Tu m'as appris énormément de choses sur le monde de la recherche mais aussi sur moi-même. Entre autres, tu m'as dit plusieurs fois « Si c'était facile, ce ne serait pas drôle »... Il m'a fallu du temps pour comprendre mais cette petite phrase m'a aidée et m'aidera encore j'en suis sûre dans les moments difficiles. Merci de m'avoir laissé prendre les rênes de ma thèse et m'écarter de la thématique du laboratoire, les macrophages interstitiels, pour m'enfoncer dans le monde du neutrophile. Tu m'as appris à voir grand et à être ambitieuse en sciences, je t'en remercie profondément.

Je remercie également mon premier co-promoteur, le docteur Christophe Desmet pour son esprit critique, ses remarques très pertinentes et ses connaissances impressionnantes qu'il nous a partagées tout

au long de mes différents projets ainsi que le docteur Marie Toussaint pour son aide inestimable pour le projet. Merci au professeur Nathalie Jacobs pour les nombreuses et surprenantes découvertes culinaires.

Ensuite, évidemment, merci Cath !! Merci de m'avoir appris le métier de chercheur sur le terrain, malgré ma bouletitude de vétérinaire de formation, tu as réussi à m'apprendre à être organisée, rapide et structurée à la bench. Tu n'as rien pu faire par contre pour le désordre, mais crois-moi, certaines personnes se donnent beaucoup de mal depuis 32 ans et n'y sont toujours pas arrivées, je pense que c'est peine perdue. Tu es aussi devenue une amie, une confidente au fil des années, sur laquelle j'ai toujours pu compter et ce pour encore longtemps j'espère. Merci pour ces congrès ensemble, les longues heures passées dans le L3 et ton sérieux dans des situations plus que drolesques (« Et maintenant, vous pouvez vous regarder dans la vitre..... »).

Merci à tous mes super collègues, qui ont illuminé (oui oui, rien que ça) mes journées et donné l'envie d'aller bosser les jours un peu moins motivants.

Mes super géniaux co-doctorants, Adouille et Tigrou (même si Tigrou n'a pas fait l'ensemble du parcours du combattant avec Ade et moi... Bien joué ☺). Par où commencer ?!? Adouille, merci pour ta bonne humeur et ta folie (oui oui, on se souvient tous que la photo krik/pipette est sûrement ton idée :p) au labo. Merci de m'avoir donné l'envie de me mettre à la course à pied, de me motiver à me fixer des objectifs trop cool et de m'emmener dans des aventures de malade où le style (ski, descente, général) n'est heureusement pas requis! Merci aussi pour ton soutien moral et logistique sur le plan professionnel et personnel ces derniers mois... T'es une sacrée gonzesse, j'ai énormément de chance d'avoir une amie floquet comme toi ! Hold on, la fin est proche pour toi aussi et ce sera un fameux feu d'artifice !! Tigrou, notre syndrome de la Tourette préféré, spécialiste de Rihanna et autres pussycat dolls, merci pour les innombrables jurons, pour tous nos fous rires, nos courses à travers le labo et aussi nos longues discussions du vendredi après 17h ou dans le SAS de l'A2 où nous n'étions (presque) jamais d'accord mais qui m'ont beaucoup fait réfléchir. Je garde le projet « chez Ben » dans un coin de ma tête comme plan de secours...

Soso, merci d'avoir soutenu mes choix musicaux en toutes circonstances (au labo, en teambuilding, en soirée, au réveil, douloureux pour certains :D...), d'avoir affronté avec moi collé-serré, de nous avoir beaucoup fait rire avec de nombreuses remarques cultes que je tairai ici car je t'aime bien, merci pour tes fous rires, ta joie et le petit fumet que tu nous ramenait parfois de tes TP physio....

Dodo, nos pauses lol cat me manquent tellement, n'oublie pas de repasser au +4 plus souvent (et aussi dans la pièce « tu sais où »). Merci pour ton dynamisme, ta bonne humeur, tes encouragements, conseils et ton écoute précieuse qui m'ont toujours reboostée dans les moments moins marrants.

Merci à Jojo pour ses jeux de mots bons et parfois moins bons mais toujours très stimulants, ses blind test et autres quizz incroyables mais aussi et surtout d'avoir traversé avec moi un des projets les plus...étranges de ma thèse, le projet c-maf. Grâce à toi, je garde de ce projet des souvenirs de rigolades,

de flamand, de démontages de portes, de karaoké et de grands moments de suspense et c'est le plus important.

Pipi, le plus grand fan d'Ariel que je connaisse, merci d'avoir partagé ma passion des disney, d'avoir immortalisé beaucoup trop de moments gênants de ma thèse (bon, allez, ça fait de bons souvenirs...), de m'avoir régulièrement gratté la tête et de m'avoir cédé ta chaise.

Audi, merci pour nos discussions de poneys, pour la danse de la fougère que tu maîtrises à la perfection et la découverte de la tarte al djote.

Jéjé, merci de m'avoir transmis tout ton savoir en matière de western blot, j'en ai vu des beaux citrullins grâce à toi depuis.

Merci à notre bon Cédredindon pour tout le boulot réalisé afin de nous permettre de travailler sans soucis, dans un labo en ordre (et ça ! C'est pas rien !) et où presque jamais rien ne manque. Merci pour tes blagues, pour tes imitations, avec une mention spéciale pour le saxophone de la panthère rose qui restera à jamais gravé dans ma mémoire...

Pupu, merci d'avoir essayé, avec beaucoup de patience de m'apprendre à jouer à la balle, de baseball, à travers le labo. Certains ordi ont parfois eu chaud, certaines personnes ont parfois failli perdre des parties de leur corps, mais au final, je ne sais toujours pas lancer une balle correctement... Merci, bien sûr, de nous avoir beaucoup beaucoup fait rire, qui aurait pu croire qu'un gros triton roux soit aussi marrant !!

Merci à Laurence pour sa disponibilité, ses précieux conseils, le partage de ses connaissances, de sa science et de ses très nombreux protocoles.

Dimi, notre référence en génétique et sa force tranquille, merci d'amener un peu de calme dans ce laboratoire d'agités, merci pour tes théories et analyses de Game of thrones (un peu foireuses il faut l'avouer, non, Ned Starck n'était pas un personnage central.....) et autres Stranger things ou Star wars.

Stefy, merci pour tes délicieux spaghetti, de nous avoir appris que, oui, les plafonds se nettoient, tes petites siestes et tes impressionnantes listes de questions lors des réunions.

Gene, ta bonne humeur et ta gentillesse ont fait de la mise au point de ces fameuses souris ITIB une partie de plaisir (ou presque...) !

Merci à Claire de m'avoir révélé les secrets de base de la cytométrie en flux et initiée à la vie au GIGA à mon arrivée au labo.

Claudia, merci de m'avoir fait découvrir les pasteis de nata, de nous avoir beaucoup fait rire avec tes airs faussement choqués et tes grands yeux écarquillés.

Merci à Qiang pour son aide dans un domaine, ô combien obscur pour moi, la bioinfo.

Merci aux petites nouvelles de labo, qui arrivent maintenant à la fin de leur thèse...

Célin, Godefroid de Bouillon hein, merci pour tes gros fous rires, tes tartines-chocolat zéro, ton accent parfois prononcé, ta maîtrise des co-cultures et du Fortessa, tes contacts à travers tout le GIGA

et surtout... Merci de chanter aussi bien et autant que moi... Grâce à toi, je ne me suis plus jamais sentie seule en hurlant comme une casserole à travers le labo (pardon Dimitri)...

Maude, merci pour ta positive-attitude et ton optimisme en tout temps. Merci aussi pour ta culture musicale et générale (de nouveaux talents et vidéos à ne pas manquer...), l'organisation d'événements mémorables (raclette de noel) et tes très bonnes idées (cacahuète garage, karaoké,...). Tu vas nous manquer dans quelques mois mais tu mérites tellement cette super aventure !!

Moesmoes, notre discret (jusqu'il y a peu) voisin de génétique, je ne sais plus exactement quand nous avons commencé à t'englober dans le labo, mais c'était une excellente idée ! Merci pour tes petites vanes qui me rappellent que en fait, non, je ne suis pas SI vieille, pour ton humour... euh... étrange, d'entretenir mon ouïe en marmonnant des informations souvent importantes dans ton coin et pour tes monologues que j'ai toujours écouté avec intérêt et attention (oui, oui !).

Charles, merci de nous avoir supportés pendant toutes ces années, pour tes petites blagues discrètes mais bien placées et pour tes belles photos.

Merci aux derniers arrivants ! Marlon, Marlito-Calogero, merci pour ton esprit caustique, tes danses avec skin, tes expressions de jeune qui m'ont maintenue à jour, ton amour d'une poubelle qui restera inoubliable, nos nombreuses discussions et partages de secrets. Merci à Joseph, disco dingo, pour sa culture intensive de Francinne qui embellit notre bureau.

Merci aux chicas du Marichal lab, Ceci, Mama et Paupau... J'avais un peu peur du vide de l'après thèse mais grâce à vous trois (et Thomas, bien sûr), il n'y a pas eu une seconde de vide et j'ai pu direct me réjouir de la suite, ce qui est, je pense, une très grande chance !

Ceci, notre soleil du Marichal lab, merci d'être toujours de bonne humeur et d'amener un peu de sud et de chaleur dans la team. Merci pour ta coolitude, pour mes cours d'italien, pour le maddison, nos discussions nocturnes en congrès et... de partager ma passion des neutrophiles con la ciliegia.

Mama, mon criquet porte bonheur, merci pour ta folie, ta motivation sans limites, ta générosité, ton amour d'Enrique et Sean Paul, ta technique de danse particulière. J'ai eu du bol de t'avoir comme première stagiaire et je me réjouis de continuer sur notre lancée au labo, à l'esca, à la course ou sur le dancefloor !

Paupau, que ferait-on sans toi ? Merci de gérer tous ces trucs essentiels pour nous, merci d'être toujours là quand on a besoin de toi, merci pour tes expressions ardennaises, pour tes trucs et astuces zéro-waste, tes coutumes rigolotes, ton écoute et tes bons conseils aussi bien sur le plan professionnel que personnel.

Merci à la plateforme d'imagerie/cytométrie en flux : merci à Raafat d'avoir géré tant et tant de tris, avec ou sans masque à gaz, de m'avoir appris à utiliser toutes ces machines qui courent les yeux de la tête, merci pour ta confiance et aussi de me laisser mettre Kendji à fond dans ton antre de temps en temps. Merci à Sandra et Jean-Jacques pour leur aide et particulièrement à Alex pour toutes ces belles

images réalisées (dont la magnifique cover de cette thèse à défaut de Nat Immunol) et toutes celles à venir.

Merci aux membres de l'animalerie, à Luc et Gaelle en particulier, à qui nous faisons souvent tourner la tête mais qui sont toujours disponibles et prêts à nous aider lorsqu'il le faut.

Merci à la team viral vector, à Manu de m'avoir porté secours de nombreuses fois dans le L3 que ce soit pour la température, la lumière, la ventilation, les déménagements et aussi de supporter ma bordelitude... Merci François pour ta joie de vivre et ton sourire tous les matins... mais surtout pour le bien dénommé François Rumba et quand même ton aide bien sûr...

Merci à la plateforme d'immunohisto, à Chantal pour sa gentillesse et sa disponibilité mais aussi de m'avoir si souvent ouvert lorsque je venais rendre visite à Céline... aux filles, Alice, Tiffany et Hulya pour leur sympathie et toutes ces demandes urgentes auxquelles elles ont répondu dans la bonne humeur.

Merci au professeur Didier Cataldo et son équipe pour leur aide pour la partie ozone du projet, en particulier à Céline pour son aide précieuse, pour nos longues discussions « neutrophiles-NETs » qui sont maintenant devenues des discussions toujours scientifiques mais aussi de tout et rien, c'est toujours un plaisir de passer te rendre visite !! Merci à Fabienne pour la gestion du flexivent et ses bons conseils.

Merci à tous nos collègues de la pneumo pour la bonne ambiance, en particulier à Monique qui nous a énormément écoutés et encouragés dans une période très difficile et ce parfois jusque très tard le soir...

Merci à Raja et Ilham pour leur aide précieuse dans mes très nombreuses questions administratives. A Axelle, Benoît et toute l'équipe du +5 au GIGA pour leur aide logistique, toujours dans la bonne humeur.

Je remercie également le professeur Renaud Louis et le professeur Stéphane Schurmans, les membres de mon comité de thèse, en particulier Stéphane d'avoir toujours été présent et de bons conseils dans mes nombreux projets de thèse.

Merci aux membres de jury externes, les docteurs Laurent Reber et Hamida Hammad, ainsi qu'aux membres internes les docteurs Florence Schleich et Bénédicte Machiels, les professeurs Alain Vanderplasschen et Frédéric Baron ainsi qu'à mon président, le professeur Laurent Gillet pour l'évaluation de mon manuscrit et notre discussion enrichissante lors de ma défense privée.

Heureusement, mes remerciements ne s'arrêtent pas là... En plus de toutes les personnes du GIGA, j'ai également pu compter sur des merveilleuses personnes en dehors du cadre professionnel.

Merci à mes amis, au CCDQA, à la tribu des vétés et au groupe 10, merci à vous tous de m'avoir toujours écoutée, soutenue et surtout de m'avoir permis de bien décompresser, parfois d'oublier cette thèse et toujours beaucoup fait rigoler ! Merci à mes copines de poney : Ella, Flo, Paupau, Cécé, Laulau et Manon de m'avoir si souvent changé les idées au cours de balades, leçons d'obstacles, concours ou goûters !

Merci à Vincent de m'avoir accompagnée et soutenue pendant ces longues années.

Merci à ma famille, on dit toujours qu'on ne la choisit pas et heureusement, car si j'avais dû choisir, je ne l'aurais certainement pas aussi bien fait moi-même... à mes cousines et mon cousin, mes oncles et tantes, mes neveux et ma nièce et ma bonne mimine merci d'être vous, d'être là, merci de vous être toujours intéressés au destin de mes souris tout au long de ses nombreuses années sans jamais vous lasser.

Merci à mon grand frère de m'avoir beaucoup chambrée sur mon éternelle condition d'étudiante et d'être toujours là pour me soutenir quand il le faut.

Et surtout... Merci à mes parents. Tout d'abord, merci de m'avoir permis d'avancer et de foncer sans jamais me soucier de mes arrières, merci de m'avoir permis de faire des longues études de vétérinaire, suivies d'une très longue thèse. Merci de m'avoir toujours fait confiance et soutenue dans tous mes choix. Vous m'avez appris que quand on donne le meilleur de soi, on est toujours récompensé, qu'il faut travailler pour arriver et inculquer un sens de la détermination. Sans ces valeurs que vous m'avez transmises et votre soutien, ce travail n'aurait pas abouti, c'est certain.

Abréviations

ACKR	<i>Atypical chemokine receptor kinase</i>
ADAM	<i>A Disintegrin And Metalloproteinase</i>
AGCC	Acides gras à chaînes courtes
ANCA	<i>Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies-associated</i>
APRIL	<i>A proliferation inducing ligand</i>
ARDB	<i>Beta-2 adrenergic receptor</i>
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
BAFF	<i>B cell activating factor</i>
BMDCs	<i>Bone marrow derived dendritic cells</i>
C/EBP	<i>CCAAT enhanced binder protein</i>
CCL	<i>Chemokine (C-C motif) ligand</i>
CCR	<i>C-C chemokine receptor type</i>
CD	Cluster de différenciation
CDs	Cellules dendritiques
CEP	Cellules épithéliales pulmonaires
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4</i>
DAMP	<i>Damage associated molecular pattern</i>
Flt	<i>Fms-like tyrosine kinase</i>
FOXP3	<i>Forkhead box P3</i>
GATA	<i>Trans-acting T-cell-specific transcription factor</i>
G-CSF	<i>Granulocyte-colony stimulating factor</i>
GFI	<i>Growth factor independence 1</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte Macrophage-colony stimulating growth factor</i>
GMP	<i>Granulocyte Monocyte Progenitor (progéniteur de monocytes-granulocytes)</i>
HMGB1	<i>High mobility group box 1</i>
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i>
IL	Interleukine
IRAK	<i>IL-1 récepteur-associated kinase</i>
LDN	<i>Low density neutrophils</i>
LFA	<i>Lymphocyte function-associated antigen</i>
LPS	Lipopolysaccharide
LTB4	Leucotriène B4
MBP	Protéine basique majeure
MHC	Complexe majeur d'histocompatibilité
MIP	<i>Macrophage inflammatory protein</i>
MMP	<i>Matrix Metalloproteinase</i>
moCD	Cellule dendritique dérivée de monocyte
MPO	Myéloperoxydase
Mregs	Macrophages régulateurs
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NE	Neutrophile élastase
NETs	<i>Neutrophil extracellular traps</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor Kappa B</i>
NK	<i>Natural killer</i>
NKT	<i>T Natural killer</i>
NO₂	Dioxyde de nitrogène
NOD	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain</i>
NP	Nucléoprotéine
NS	Non structurel

O₃	Ozone
OVA	Ovalbumine
PAD	<i>Peptidyl arginine deaminase</i>
PAMP	<i>Pathogen associated molecular pattern</i>
PAR	<i>Protease associated receptor</i>
PI3K	<i>Phosphatidyl inositol 3 kinase</i>
PR3	Protéinase 3
PRR	<i>Pattern recognition receptors</i>
PSLG	<i>P-selectine glycoprotéine ligand</i>
RIP3K	<i>Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3</i>
ROR	<i>RAR-related orphan receptor</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RSV	Virus syncytial respiratoire
RV	Rhinovirus
SO₂	Dioxyde de soufre
STAT	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>
TCR	<i>T cell receptor</i>
TFH	<i>T follicular helper</i>
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
Th	<i>T helper</i>
TIMP	<i>Tissue inhibitors of Metalloproteinases</i>
TLR	<i>Toll like receptor</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
Tregs	T régulateurs
TSLP	<i>Thymic stromal lymphopoietin</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

TABLE DES MATIERES

RÉSUMÉ - ABSTRACT	1
INTRODUCTION	4
1.1 L'ASTHME	5
1.1.1 Définition	5
1.1.2 Epidemiologie	6
1.1.3 Asthme allergique	6
1.1.3.1 Définition	6
1.1.3.2 Pathophysiologie : sensibilisation allergique	7
1.1.3.3 Pathophysiologie : la réexposition à l'allergène	11
1.1.3.4 Pathophysiologie : le remodelage tissulaire	12
1.1.4 Etiologie	13
1.2 LES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX PRO-ALLERGIQUES	14
1.2.1 Hypothèse de l'hygiène	14
1.2.1.1 Généralités	14
1.2.1.2 L'effet ferme	15
1.2.2 Infections virales respiratoires	20
1.2.2.1 Le virus influenza	22
1.2.3 Pollution aérienne	25
1.2.3.1 Ozone	25
1.3 LES NEUTROPHILES	27
1.3.1 Généralités	27
1.3.2 Origine	28
1.3.3 Trafficking	28
1.3.4 Fonctions	32
1.3.4.1 Rôle dans les processus infectieux : interactions avec les agents pathogènes	32
1.3.4.2 Rôle dans les processus non infectieux	35

1.3.4.3	Rôle dans la régulation des systèmes immunitaires inné et adaptatif.....	36
1.3.5	<i>Hétérogénéité des neutrophiles.....</i>	38
1.4	LES NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS (NETS)	41
1.4.1	<i>Définition.....</i>	41
1.4.2	<i>Formation.....</i>	42
1.4.3	<i>Régulation</i>	43
1.4.4	<i>Elimination.....</i>	44
1.4.5	<i>Fonctions.....</i>	45
1.4.5.1	Rôle dans la défense de l'hôte	45
1.4.5.2	Rôle dans la régulation des cellules immunitaires	45
1.4.5.3	Rôle dans les processus non-infectieux	46
1.5	LES RÔLES DES NEUTROPHILES DANS L'ASTHME ALLERGIQUE	47
1.5.1	<i>Recrutement des neutrophiles dans les voies aériennes lors d'asthme allergique.....</i>	47
1.5.2	<i>Caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des neutrophiles dans l'asthme allergique.....</i>	49
1.5.3	<i>Contribution des neutrophiles à la pathogénie de l'asthme allergique.....</i>	50
	OBJECTIFS	54
	SECTION EXPERIMENTALE.....	55
	DISCUSSION-PERSPECTIVES.....	85
	LISTE DES PUBLICATIONS	141
	ANNEXES.....	143

Résumé - Abstract

Résumé

Au cours de ces dernières décennies, l'asthme allergique est devenu un problème de santé publique majeur, touchant plus de 300 millions de personnes à travers le monde. La pathophysiologie de la maladie est de mieux en mieux comprise et est basée sur l'induction d'une réponse immunitaire aberrante de type 2 dirigée contre un antigène environnemental inoffensif ou allergène. Cependant, son étiologie reste largement inconnue. Tandis que des prédispositions génétiques peuvent influencer le développement de la maladie, l'augmentation rapide de sa prévalence suggère une contribution majeure de changements environnementaux dans l'issue de la pathologie. En effet, plusieurs études épidémiologiques ont identifié des conditions environnementales particulières comme facteurs de risque majeurs de développement de l'asthme allergique, telles que les modes de vie urbains associés à de faibles expositions aux produits dérivés de bactéries comme le lipopolysaccharide (LPS), les infections virales respiratoires et la pollution de l'air ambiant. Les liens mécanistiques reliant ces conditions particulières à la susceptibilité à développer une immunité de type 2 restent largement inconnus. Afin de répondre à cette question, nous avons évalué la réponse immunitaire innée induite suite à une exposition de souris à trois environnements pro-allergiques : une exposition à de faibles doses de LPS, une infection respiratoire à influenza A H1N1 ou une exposition à l'ozone. Nous avons tout d'abord mis en évidence la présence de neutrophiles particuliers, exprimant les marqueurs CXCR4, CD49d et Lamp-1, au niveau des poumons de souris exposées aux trois environnements pro-allergiques. L'acquisition de ce phénotype se produit localement au niveau du poumon, ce dernier constituant une niche pro-allergique. Dans le modèle d'exposition à de faibles doses de LPS, l'inhibition du recrutement de ces neutrophiles ou leur transfert adoptif à des souris naïves nous ont permis de démontrer qu'ils étaient nécessaires et suffisants pour potentialiser la réponse allergique pulmonaire de type 2 à l'encontre d'extraits d'acariens (house dust mite, HDM). De plus, ces neutrophiles CXCR4^{high}CD49d^{high}Lamp-1^{high} montrent une forte propension à libérer des « Neutrophil Extracellular Traps (NETs) », ex vivo et in vivo, qui médient la susceptibilité à développer de l'asthme. En effet, l'inhibition de ces NETs ou leur destruction dans des modèles d'asthme allergique induit par les trois environnements pro-allergiques (faibles doses de LPS, infection au virus influenza A H1N1 ou exposition à l'ozone) réduisent fortement les caractéristiques de l'asthme allergique dans nos modèles. Enfin, le mécanisme par lequel les NETs favorisent le développement d'une réponse immunitaire de type 2 repose sur l'augmentation de la capture de l'antigène par une sous-population de cellules dendritiques CD11b⁺Ly-6C⁺CD64⁺ connues pour leur capacité à induire une réponse de type 2, les monocyctic-derived dendritic cells (mo-DCs), et ce lors d'une exposition à chaque environnement pro-allergique testé. En conclusion, ce travail nous a permis d'établir un rôle de neutrophiles particuliers et des NETs, habituellement associés à l'immunité adaptative Th1 ou Th17, dans l'induction d'une réponse Th2 sous-tendant l'asthme allergique. En outre, nous avons découvert comment trois environnements pro-allergiques non apparentés façonnent de manière similaire le système immunitaire inné en modifiant les neutrophiles afin qu'ils libèrent des

NETs, ces derniers permettant de faciliter la capture de l'antigène par les moDCs et favorisant ainsi la sensibilisation allergique.

Summary

Over the last decades, allergic asthma has become a major public health threat, affecting more than 300 million people worldwide. The pathogenesis of the disease is relatively well understood and is based on the induction of an aberrant immune response with a predominant type 2 helper T cell (Th2) profile directed against harmless environmental antigens, called allergens. Yet, its aetiology remains largely unknown. While genetic predispositions can influence disease susceptibility, the rapid increase in its prevalence suggests a major contribution of the environment in disease outcome. In this respect, several epidemiological studies have identified specific environmental conditions as major risk factors for allergic asthma, such as urban lifestyles associated with a low exposure to bacterial products like lipopolysaccharide (LPS), respiratory viral infections or air pollution. Understanding how such apparently unrelated environments are mechanistically linked to host type 2 allergic susceptibility is still missing and could open new therapeutic avenues. To address this unmet need, we investigated the innate immune response induced by exposure of mice to three pro-allergic environments: an exposure to low doses of LPS, a respiratory infection with influenza A H1N1 or an exposure to ozone. We first detected the presence of particular neutrophils expressing CXCR4, CD49d and Lamp-1 in the lungs of mice exposed to these pro-allergic environments. The acquisition of such phenotype takes place locally in the lung, which constitutes a pro-allergic niche. In the model of pro-allergic low dose LPS exposure, inhibition of lung neutrophil recruitment or adoptive transfer of $Cxcr4^{high}Cd49d^{high}Lamp-1^{high}$ neutrophils to naïve mice demonstrated that such neutrophils were necessary and sufficient to promote type 2 allergic airway inflammation to house dust mite (HDM). Furthermore, these neutrophils were found to release high amounts of « Neutrophil Extracellular Traps » or NETs, ex vivo and in vivo, which mediated susceptibility to develop allergic asthma. Indeed, inhibition or degradation of these NETs in models of allergic asthma induced by the three pro-allergic environments (i.e., low LPS doses, infection with influenza A virus or ozone exposure) decreased all features of asthma in our models. Finally, the underlying mechanism by which NETs promote induction of type 2 immunity relies on their ability to increase the antigen uptake by $CD11b^{+}Ly-6C^{+}CD64^{+}$ dendritic cells or monocytic derived cells (moDCs), known to mediate type 2 immunity to HDM, and this upon exposure to each of the three pro-allergic environments tested. In conclusion, our findings reveal a role for particular neutrophils and NETs, which are usually associated with Th1 and Th17 immune responses, in the induction of Th2 response underlying allergic asthma. Moreover, we have uncovered how apparently unrelated environments commonly shape the lung innate immune system, namely by instructing lung neutrophils to release NETs, which facilitates allergen uptake by moDCs and promotes allergic sensitization.

Introduction

1 Introduction

1.1 L'asthme

1.1.1 Définition

Le terme « asthme », du latin *asthma* - respiration difficile -, désigne un ensemble hétérogène de troubles respiratoires caractérisés par une symptomatologie commune comprenant une dyspnée, de la toux et une obstruction réversible des voies aériennes (Holgate, 2010). Ces dernières années, de nombreux groupes de recherche ont tenté de classifier ces différents troubles en fonction de plusieurs critères, tels que le tableau clinique, les éléments déclencheurs, la réponse au traitement ou encore le statut immunitaire ou inflammatoire (Wenzel, 2006). Selon ce dernier critère, on peut discerner quatre catégories principales d'asthme en fonction du type cellulaire majoritairement présent dans les voies aériennes: l'asthme éosinophilique, neutrophilique, mixte ou paucigranulocytaire (absence d'une infiltration de cellules inflammatoires particulières) (Schleich et al., 2013) (Table 1). Dans ce travail, nous nous intéresserons principalement à l'asthme éosinophilique.

Table 1. Catégories principales d'asthmes et leurs caractéristiques

<i>Phenotype</i>	<i>Cellules inflammatoires au niveau des voies respiratoires (sputum)</i>	<i>Biomarqueurs Immunologiques et Inflammatoires</i>	<i>Sévérité</i>	<i>Facteurs Déclencheurs</i>	<i>Profil Immunitaire</i>
<i>Eosinophilique</i>	Eosinophiles (>3%) Neutrophiles (<76 %)	IgE spécifiques Cytokines Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) (Maes et al., 2016; Manise et al., 2013)	Modéré à sévère	Allergènes (75%) Exercice Occupationnel (15%) Aspirine	Th2 >>> Th17
<i>Neutrophilique</i>	Neutrophiles (>76%)	IL-8 Neutrophile Elastase IL-1β TNF-α micro RNA-629-3p, 223-3p et 142-3p (Maes et al., 2016)	Sévère	Obésité Fumée de cigarette Exposition à des agents irritants	Th17 >>> Th2
<i>Paucigranulocytaire</i>	Eosinophiles <3% et Neutrophiles <76%	?	Modéré	Non défini	?
<i>Mixte</i>	Eosinophiles (>3%) et Neutrophiles (>76%)	?	Sévère	Non défini	Th2/Th17?

1.1.2 Epidémiologie

En 2018, 339 millions de personnes souffrent d'asthme (Global Asthma Report, 2018), soit 4,3% de la population mondiale (Loftus and Wise, 2016). Ces pourcentages varient très fortement selon la localisation géographique, allant de 0,2% en Chine à 21,5% en Australie avec une très haute prévalence dans les pays occidentaux (Australie : 21% ; Suède : 20,2% ; Royaume-Uni : 18,2%, Pays-Bas : 15,3%) (To et al., 2012). Selon les estimations du *global asthma network*, ce chiffre devrait augmenter de 100 millions d'ici 2025 (Loftus and Wise, 2016). Parmi les asthmatiques, la majorité des enfants et 50% des adultes souffrent d'asthme allergique (Lambrecht and Hammad, 2015).

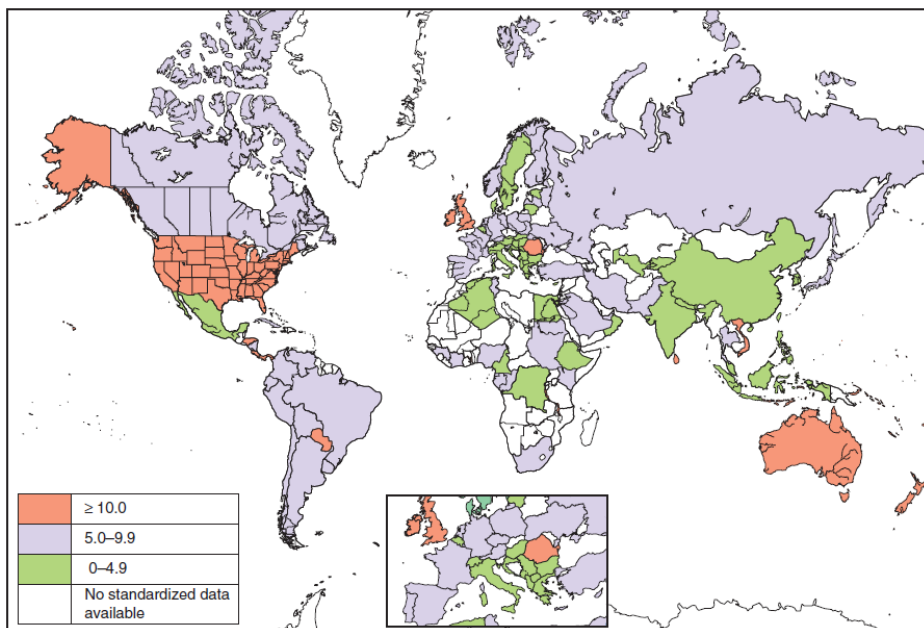


Figure 1. Prévalence de l'asthme à travers le monde. Répartition des cas d'asthme en fonction de la zone géographique. Les zones rouges comprennent plus de 10% d'asthmatiques, les zones grises de 5 à 9,9%, les zones vertes de 0 à 4,9%. Les zones non colorées ne disposent pas de données. (D'après le Global Initiative For Asthma, Online appendix, 2014, (Holgate and Thomas, 2017)).

1.1.3 Asthme allergique

1.1.3.1 Définition

L'asthme allergique est la conséquence du développement d'une réponse immunitaire aberrante, dite « de type 2 », dirigée contre un ou plusieurs antigènes environnementaux inoffensifs, communément appelés allergènes. Parmi ces allergènes, les extraits d'acariens (*house dust mites*, HDM, BOX 1), les pollens, les poils d'animaux et les moisissures sont le plus souvent responsables de l'apparition d'asthme allergique (Lambrecht and Hammad, 2015).

BOX 1 Les extraits d'acariens sont une source majeure d'aéroallergènes chez les patients souffrant d'asthme allergique. On estime que 1 à 2% de la population mondiale présente une sensibilisation allergique aux extraits d'acariens (Calderón et al., 2015), soit 50 à 85% des asthmatiques (Gregory and Lloyd, 2011). Les espèces les plus représentées dans les pays occidentaux sont *Dermatophagoides pteronyssinus* et *Dermatophagoides farinae*. L'allergénicité du HDM repose notamment sur l'activité protéolytique de certains de ses composants (Der p 1, Der f 1) ou le potentiel d'interaction avec le système immunitaire de ses allergènes (Der p 2 et Der f 2) ou d'autres composants (lipopolysaccharide [LPS], chitine, β -glucans) (Gregory and Lloyd, 2011). Les allergènes Der p 1 et Der p 2 sont les plus pertinents d'un point de vue clinique et partagent d'importantes homologues entre les différentes espèces d'acariens (Calderón et al., 2015).

L'asthme allergique est principalement caractérisé par une inflammation éosinophilique des voies respiratoires, une production importante de cytokines de type 2 (interleukine [IL]-4, IL-5 et IL-13), une augmentation de la sécrétion de mucus, une augmentation d'immunoglobulines (Ig) de type E (IgE) totales et spécifiques de l'allergène et une hyperréactivité bronchique (Wenzel, 2012).

1.1.3.2 Pathophysiologie : sensibilisation allergique

L'utilisation de modèles murins récapitulant les caractéristiques de l'asthme allergique a largement contribué à la compréhension de la pathophysiologie de la maladie (Anderson et al., 2017; Locksley, 2010). L'initiation de la réponse allergique asthmatique se déroule au niveau de l'épithélium pulmonaire. Les cellules épithéliales pulmonaires (CEPs), longtemps considérées comme une simple barrière physique protégeant le poumon de l'environnement extérieur, sont en réalité pourvues de nombreux récepteurs de l'immunité innée leur permettant d'identifier directement certains motifs particuliers des allergènes ou indirectement les produits dérivés d'activités enzymatiques des allergènes (Lambrecht and Hammad, 2012). Par exemple, le *toll like récepteur 4* (TLR4, le récepteur au lipopolysaccharide, LPS) peut être activé directement par Der p 2 (Trompette et al., 2009), le LPS contenu dans de nombreux allergènes (Eisenbarth et al., 2002) ou des produits dérivés du fibrinogène (Millien et al., 2013). Par ailleurs, *dectine 1*, un récepteur de type C-type lectine, peut détecter spécifiquement les motifs β -glucans des spores d'*Aspergillus fumigatus* mais aussi du HDM ou des pollens (Finkelman et al., 2006; Nathan et al., 2009). D'autre part, de nombreux allergènes ont une action protéolytique intrinsèque qui peut être détectée par les *protease activated receptors* (PARs) ou entraîner un clivage des jonctions serrées de l'épithélium, compromettant de cette manière son intégrité (Lambrecht and Hammad, 2014). L'activation des cellules épithéliales entraîne la libération de signaux de danger ou *danger associated molecular pattern* (DAMPs) (comme l'adénosine triphosphate, ATP ou l'acide urique) ainsi qu'une activation du facteur de transcription *nuclear factor-kappa B* (NF- κ B) (Österlund et al., 2009), qui à son tour promeut la sécrétion de différentes chimiokines, telles que la

chemokine (C-C motif) ligand 20 (CCL20) ou CCL2 (Nathan et al., 2009). Ces dernières conduisent à l'amplification de la réponse immune innée en recrutant, au niveau du poumon, des cellules présentatrices d'antigène professionnelles immatures, les cellules dendritiques conventionnelles (cCDs) CD11b⁺ (Hammad et al., 2009) et les CDs dérivées de monocytes (moCDs) (Plantinga et al., 2013) qui renforcent l'action des cCDs résidentes pulmonaires (BOX 2).

BOX 2 Chez la souris, les cellules dendritiques (CDs) dérivent d'un progéniteur commun exprimant *Fms-like tyrosine kinase 3* (Flt3) au niveau de la moelle osseuse (Guilliams et al., 2016). Les cellules dendritiques pulmonaires peuvent être subdivisées en deux grands groupes : les CDs conventionnelles (cCDs) et les CDs plasmacytoïdes (pCDs). Les cCDs peuvent à leur tour être subdivisées en deux sous-populations : les cCDs 1 CD103⁺XCR1⁺ et les cCDs 2 CD11b⁺CD172⁺ (Lambrecht et al., 2017). C'est ce dernier sous-type qui est principalement responsable de la sensibilisation allergique (Mesnil et al., 2012; Plantinga et al., 2013). Un troisième sous-type peut également être identifié, à savoir les moCDs dérivées non pas du précurseur dépendant de Flt3, mais des monocytes classiques exprimant Ly-6C et dépendant du *C-C chemokine receptor type 2* (CCR2). Ces moCDs partagent de nombreuses caractéristiques phénotypiques avec les macrophages, comme l'expression de MAR-1 et CD64, et ont également été décrites comme suffisantes pour induire la sensibilisation allergique aux extraits d'acariens (Plantinga et al., 2013)

De plus, les CEPs produisent des alarmines : le *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF), le *thymic stromal lymphopoietin* (TSLP), l'IL-25 et l'IL-33 (Lambrecht and Hammad, 2012). Celles-ci induisent l'activation et la maturation des cCDs, mais activent également les cellules lymphoïdes innées de type 2 (ILC2s, BOX 3) et les basophiles (Besnard et al., 2011; Ito et al., 2005; Suzukawa et al., 2012).

BOX 3 Les ILCs sont des cellules lymphoïdes dépourvues de *T cell receptor* (TCR) spécifique d'un antigène et sont donc antigène non-spécifiques (Yu et al., 2014). Elles sont subdivisées en trois groupes principaux :

-Les ILC1s, expriment le facteur de transcription T-bet et sécrètent de l'interféron (IFN) γ , mais à la différence des cellules tueuses naturelles (*natural killer*, NK), ne possèdent pas de perforines ni de granzyme B.

-Les ILC2s sont identifiées comme des cellules exprimant *Trans-acting T-cell-specific transcription factor* (GATA)3, CD25, CD90, c-kit et CD127. Elles sécrètent de l'IL-5 et de IL-13 de manière innée, ce qui leur confère un rôle important dans l'immunité de type 2. En effet, dans des

modèles murins d'asthme allergique à l'encontre de l'ovalbumine ou du HDM, les ILC2s représentent la moitié des cellules productrices de cytokines Th2 (Wolterink et al., 2012). Les ILC2s sont particulièrement impliquées dans le recrutement d'éosinophiles au niveau du poumon et l'hyperréactivité bronchique (Lambrecht and Hammad, 2014).

-Les ILC3s sont principalement situées dans les tissus lymphoïdes, expriment *RAR-related orphan receptor* (ROR)- γ t et sécrètent d'importantes quantités d'IL-17 et d'IL-22 (Scanlon and McKenzie, 2012).

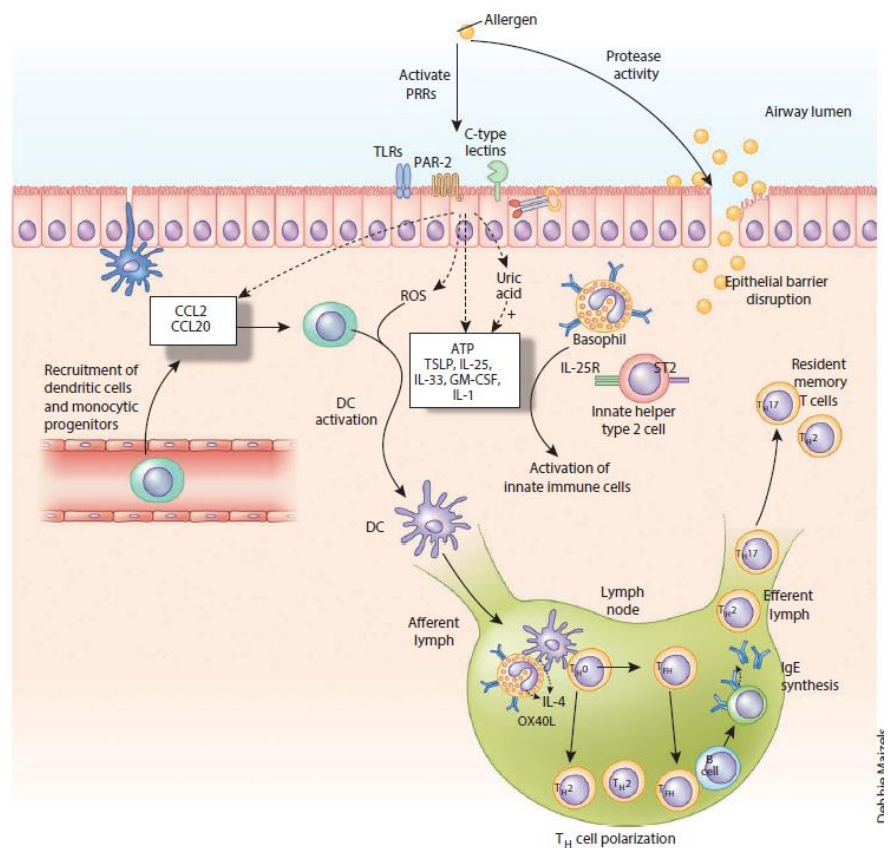
Les ILC2s sécrètent d'importantes quantités d'IL-5, d'IL-13 et d'IL-9 (Scanlon and McKenzie, 2012), tandis que les basophiles libèrent de l'IL-4 et de l'IL-13 (Lambrecht and Hammad, 2015). Ces deux derniers types cellulaires complètent l'activation et la maturation des cCDs CD11b⁺. Les cCDs, une fois activées et instruites par ces signaux, sont armées pour internaliser les allergènes présents au niveau des voies respiratoires, le digérer en fragments antigéniques qui seront présentés au niveau de leur complexe majeur d'histocompatibilité de type 2 (MHC-II) et migrer par un processus dépendant de CCR7 au niveau du ganglion lymphatique drainant (Worbs et al., 2017).

Au niveau de la zone interfolliculaire du ganglion, la cCD CD11b⁺ forme une synapse immunologique avec les lymphocytes T CD4⁺ naïfs qui transitent continuellement dans ces zones. Trois signaux déterminent la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs en lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires de type 2, appelés T *helper* 2 (Th2). Tout d'abord, la présence d'un épitope dérivé de l'allergène au niveau du MHC-II de la cCD est reconnue par le lymphocyte T naïf spécifique de cet épitope par l'intermédiaire de son TCR. Ensuite, des molécules de co-stimulation CD80, CD86 et OX40L présentes au niveau de la cCD peuvent interagir avec le CD28 présent sur le lymphocyte T naïf (Holgate, 2012). L'absence de ces molécules de co-stimulation entraîne l'anergie, à savoir l'inactivation des lymphocytes T naïfs reconnaissant l'allergène présent au niveau du MHC-II. De même, la présence de *cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4*, CTLA-4 au niveau de la cCD conjointement aux autres molécules de co-stimulation entraînera l'inhibition du lymphocyte T naïf (Rudd et al., 2009). Enfin, la différenciation du lymphocyte T naïf en Th2 repose sur la présence d'IL-4 au moment de la présentation de l'antigène. L'origine de la source de l'IL-4 est encore sujet à débat (Hammad et al., 2010). Cependant, les basophiles, vu leur forte capacité de sécrétion de cette cytokine, sont à ce jour les candidats les plus plausibles pour remplir cette fonction (Tang et al., 2010). La présence conjointe de ces trois signaux induit la phosphorylation du *Signal transducers and activators of transcription 6* (STAT6) qui, à son tour, augmente l'expression du facteur de transcription GATA3, responsable des modifications épigénétiques conduisant à la transcription de gènes codant pour les cytokines IL-4, IL-5 et IL-13, caractéristiques des lymphocytes Th2 (Paul and Zhu, 2010). Parmi ces lymphocytes Th2, les lymphocytes Th2 mémoires rejoignent les tissus par un mécanisme dépendant du CCR4 (Holgate, 2012).

Les cCDs vont également induire la formation de lymphocytes T folliculaires *helper* (TFH) qui migrent vers la zone folliculaire B. Les TFH, via la sécrétion de larges quantités d'IL-4 et d'IL-13, induisent la maturation des lymphocytes B en plasmocytes, ainsi que la commutation isotypique vers la production d'IgE (Reinhardt et al., 2009). La production d'IgE de haute affinité pour l'allergène passe par une phase intermédiaire IgG, et les IgE héritent des hypermutations somatiques et de haute affinité de la phase IgG1. Cette phase IgG1 est indispensable à la formation d'IgE de haute affinité (Xiong et al., 2012). Les IgE ainsi formés vont se fixer à la surface des mastocytes et des basophiles, mais aussi des CD4 au niveau du récepteur de haute affinité pour les IgE, le FCεRI (Lambrecht and Hammad, 2015).

Figure 2. Sensibilisation allergique.

Les CEPs activées par les allergènes amplifient la réponse en recrutant des cCDs immatures au niveau du poumon via la sécrétion de CCL2 et CCL20. D'autre part, la libération d'alarmines (IL-33, IL-25, TSLP, IL-1 et GM-CSF) et de signaux de danger (ATP, ROS, acide urique) activent les basophiles et les ILC2s. L'action conjointe de ces cellules et des CEPs aboutit à l'activation des CD4. Les CD4 activées migrent au niveau du ganglion lymphatique drainant où elles induisent la différenciation de lymphocytes Th2 effecteurs et de TFH. Les TFH favorisent la maturation des lymphocytes B en plasmocytes et la commutation isotypique vers la synthèse d'IgE. Adapté de (Lambrecht and Hammad, 2012)



D'autres sous-types de lymphocytes Th ont également été identifiés dans l'asthme allergique. Des lymphocytes Th1, dont la différenciation dépend du facteur de transcription T-bet et sécrétant de l'IFN- γ sont parfois détectés lors des phases d'exacerbation de l'asthme allergique (Lloyd and Hessel, 2010). Les lymphocytes Th17, exprimant les facteurs de transcription ROR γ t et ROR α ainsi que les cytokines IL-17A et F, sont souvent associés à un haut degré de sévérité de l'asthme (Holgate, 2012). Les lymphocytes Th9, longtemps considérés comme un sous-type de Th2, constituent un sous-type distinct induit par la présence d'IL-4, IL-2 et de *transforming growth factor* (TGF)- β . Leur différenciation dépend de la liaison de PU.1 au promoteur de l'IL-9. Leur principale caractéristique est la sécrétion d'IL-9, cytokine importante dans la prolifération et la maturation des mastocytes, dans la

synthèse d'IL-4 par les lymphocytes B et la métaplasie des cellules mucipares (Holgate, 2012; Veldhoen et al., 2008). Les lymphocytes T régulateurs (Treg) induits, caractérisés par l'expression de *Forkhead box P3* (FOXP3), sécrètent de l'IL-10 et du TGF- β , deux cytokines immunorégulatrices. Les cellules T *natural killer* (NKT) ont également été impliqués dans la pathophysiologie de l'asthme via leur rôle dans l'induction de l'hyperréactivité bronchique (Akbari et al., 2003).

1.1.3.3 Pathophysiologie : la réexposition à l'allergène

La réexposition du système immunitaire « armé » à l'allergène se déroule en deux phases, une phase aiguë et une phase retardée.

La phase aiguë survient dans les minutes suivant la réexposition ou challenge à l'allergène. Lors de l'exposition à un allergène bi- ou multivalent, le *crosslinking* d'IgE, spécifiques de cet allergène, liés aux récepteurs Fc ϵ R1 situés à la surface des mastocytes, entraîne la libération du contenu de leurs granules cytoplasmiques (histamine, sérotonine, héparine, chondroïtine sulfate, tryptase, chymase, carboxypeptidase), de chimiokines et de cytokines, de facteurs de croissance (*Tumor necrosis factor* (TNF)- α et *vascular endothelial growth factor* (VEGF)-A) ainsi que des médiateurs lipidiques dérivés du métabolisme de l'acide arachidonique (Galli and Tsai, 2012; Reber et al., 2017a). Ces médiateurs provoquent une vasodilatation, une augmentation de la perméabilité vasculaire bronchique ainsi qu'un recrutement de cellules inflammatoires telles que les éosinophiles et les lymphocytes Th2, la contraction des muscles lisses bronchiques, une sécrétion de mucus et une stimulation des nocicepteurs des nerfs sensitifs (fibres de type C) (Barnes, 2011; Galli et al., 2008). Tous ces effets vont se traduire, d'un point de vue symptomatologique, par des reniflements, des éternuements et de la toux.

La phase retardée se développe entre 2 et 6 heures après la réexposition à l'allergène. Elle est le résultat de la synthèse de nouveaux médiateurs par les mastocytes et de l'activation des lymphocytes Th2. Tandis que les mastocytes amplifient le recrutement et la maturation de cellules immunitaires via la sécrétion de cytokines (IL-5, IL-8), de chimiokines (CCL2) et de facteurs de croissance (TNF- α), les lymphocytes Th2 orchestrent la réponse de type 2 via la sécrétion d'IL-4, IL-5 et IL-13 (Finkelman et al., 2010; Galli et al., 2008). L'IL-4 induit la commutation isotypique et la sécrétion d'IgE par les plasmocytes et active l'expression de ligands nécessaires à l'extravasation des éosinophiles par les cellules endothéliales. L'IL-5 induit la production, l'activation et le recrutement des éosinophiles au niveau du poumon. L'IL-13 active les muscles lisses bronchiques et l'hyperplasie des cellules mucipares (Holgate, 2012; Lambrecht and Hammad, 2015) (Figure 3). Les éosinophiles, à leur tour, sont la source de médiateurs pro-inflammatoires (protéine basique majeure [MBP], peroxydase éosinophilique, superoxyde, produits dérivés de leucotriènes) qui entretiennent la réponse allergique (Lambrecht et al., 2017).

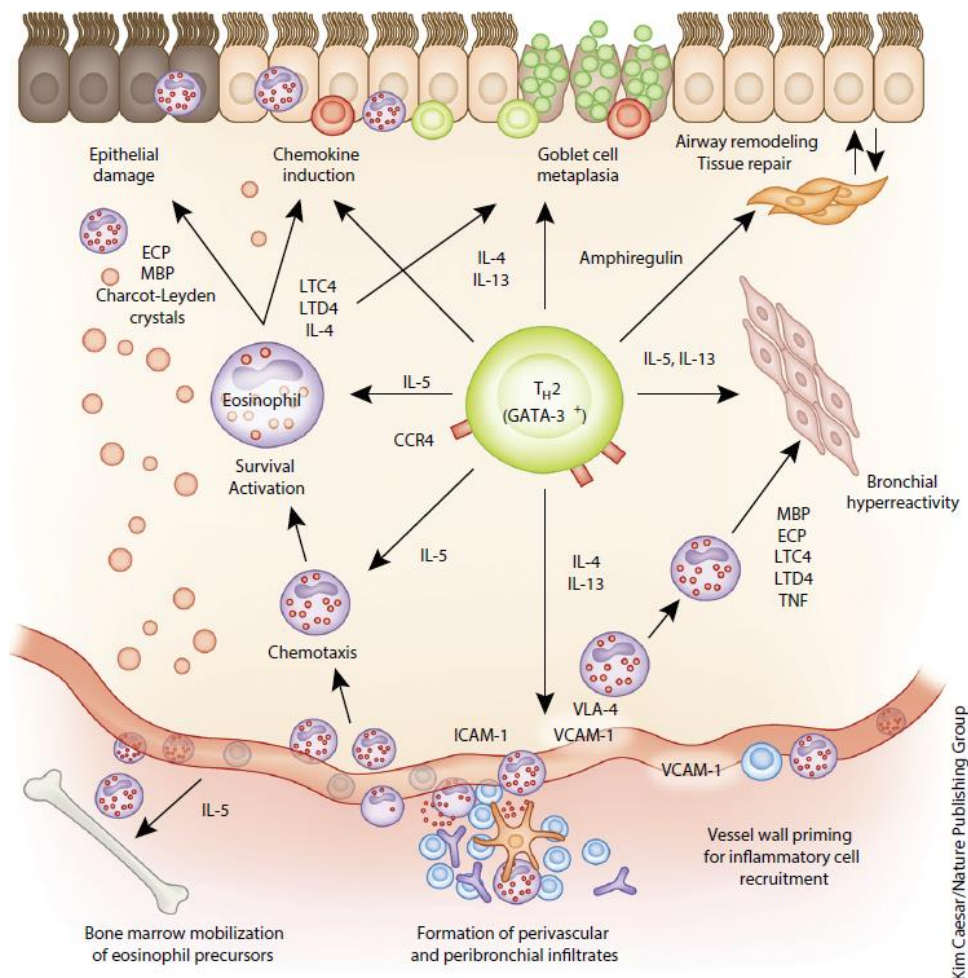


Figure 3. Effets des lymphocytes Th2. Les lymphocytes Th2 sécrètent les cytokines IL-4, IL-5, IL-13. Ces cytokines orchestrent le recrutement d'éosinophiles, l'hyperplasie des cellules mucipares, la contraction des muscles bronchiques ainsi que le remodelage des voies aériennes. Adapté de (Lambrecht and Hammad, 2015)

1.1.3.4 Pathophysiologie : le remodelage tissulaire

L'exposition chronique aux allergènes aboutit à un changement structurel des voies aériennes. En effet, l'action conjointe des basophiles, mastocytes, ILC2s, éosinophiles et lymphocytes Th2 (Lambrecht and Hammad, 2015; Pascual and Peters, 2005) conduit à un épaississement des voies aériennes suite à un déséquilibre entre le dépôt de matrice extracellulaire et sa dégradation, sous l'action des *matrix métalloproteinases* (MMP)-9 et *A Disintegrin And Metalloproteinase* (ADAM)33, de l'IL-11 et du TGF- β entre autres (Al-Muhsen et al., 2011; Holgate, 2008; Zhu et al., 2001) et des *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases* (TIMPs), une augmentation de la vascularisation de la paroi des bronches suite à la libération de VEGF (Holgate, 2008), une trans-différenciation des cellules épithéliales en cellules mucipares en réponse à l'IL-13 et l'IL-9 (Zhu et al., 2001) et une augmentation du nombre et de la réactivité des muscles lisses bronchiques causées par le TGF- β , l'IL-11 et l'IL-13

(Doherty and Broide, 2007; Galli et al., 2008; Holgate, 2008). Ces changements sont responsables de l'hyperréactivité réversible et de l'obstruction des voies respiratoires observée chez les patients asthmatiques (Figure 4).

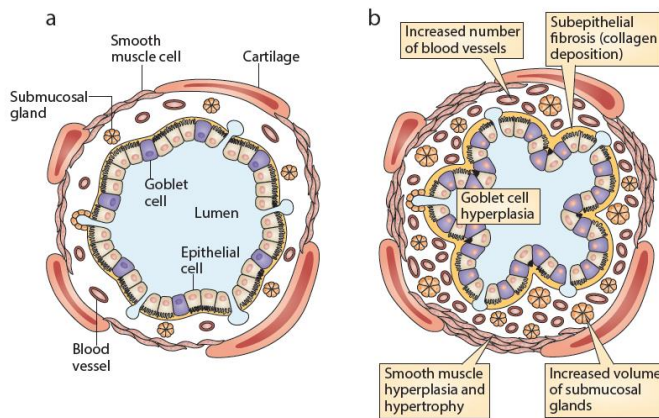


Figure 4. Remodelage des voies aériennes : comparaison de voies aériennes saines (a) et asthmatiques (b). Une exposition chronique à l'allergène induit une modification structurelle des voies aériennes. Cette dernière est caractérisée par une hyperplasie des cellules mucipares, une augmentation du nombre des fibres musculaires lisses, un épaissement de la membrane subépithéliale et une augmentation des vaisseaux sanguins. Adapté de (Kim et al., 2010)

1.1.4 Étiologie

L'étiologie de l'asthme allergique reste encore largement incomprise. La rupture de tolérance aux allergènes et le développement d'asthme allergique est le résultat d'interactions complexes entre le bagage génétique d'un individu et les stimuli environnementaux auxquels il est soumis (Busse and Rosenwasser, 2003). La contribution génétique est assez complexe et n'implique pas qu'un seul gène. Ainsi, plusieurs loci associés à l'asthme allergique ont déjà été identifiés et peuvent être classés en quatre groupes de gènes : des gènes associés à l'immunité innée et l'immuno-régulation (TLR2, TLR4, *nucleotide-binding oligomerization domain* (NOD)2,...), à la différenciation et la fonction des lymphocytes Th2 (GATA3, IL-4, IL-4R,...), à la biologie de l'épithélium et des muqueuses (CCL5, IL1R1, IL-33) et à la fonction pulmonaire (*Beta-2 adrenergic receptor* (ADRB2), TNF) (Vercelli, 2008). Cependant, la composante héréditaire ne contribuerait qu'à 60% au développement de la maladie (Locksley, 2010) et elle ne permet pas d'expliquer la forte augmentation de la prévalence observée ces dernières années (Eder et al., 2006).

1.2 Les facteurs environnementaux pro-allergiques

1.2.1 Hypothèse de l'hygiène

1.2.1.1 Généralités

Introduite pour la première fois par David Strachan en 1989, l'hypothèse de l'hygiène repose principalement sur une diminution de l'exposition à divers agents pathogènes suite à la perte des pratiques rurales, à l'industrialisation et l'urbanisation de nos modes de vie conduisant à une augmentation du niveau général d'hygiène (Strachan, 1989). Si de nos jours, l'hypothèse de l'hygiène telle que décrite par Strachan a été de nombreuses fois remaniée et remise en doute, elle n'en reste pas moins une hypothèse solide permettant d'expliquer la forte augmentation de la prévalence des maladies allergiques et de l'asthme dans les pays industrialisés (Fishbein and Fuleihan, 2012). Deux autres théories, « The good Old Friends » énoncée par Rook ainsi que la théorie de la biodiversité proposée par Haathela complètent à présent notre compréhension de la théorie de l'hygiène. Ces deux théories proposent que les modes de vie occidentaux soient accompagnés d'une diminution de l'exposition à des agents microbiens commensaux, tels que les constituants du microbiome intestinal et les parasites, avec lesquels l'homme a évolué. Ces agents microbiens commensaux ont pour fonction, très tôt dans la vie d'un individu, d'éduquer le système immunitaire afin d'éviter le développement de réponses aberrantes telles qu'observées dans les maladies allergiques (Haahtela, 2019; Rook, 2012).

D'abord, les infections parasitaires chroniques, en particulier les helminthes, sont associées à une diminution du risque de développement de l'asthme allergique (Smits et al., 2010). Cette protection repose principalement sur l'induction de la synthèse d'IL-10 par les helminthes (van den Biggelaar et al., 2000). En effet, des modèles murins d'infections aux helminthes montrent une induction de la synthèse d'IL-10 par les CD4 qui favorise la formation de Tregs (Kleij et al., 2002) capables d'inhiber les ILC2s et l'inflammation allergique (Grainger et al., 2010).

Ensuite, on observe des modifications du microbiome pulmonaire, associées à une perte de diversité, chez les patients asthmatiques (Huang, 2015). Le lien de cause à effet de ces altérations avec l'asthme allergique n'a pas été encore élucidé, il est en effet assez difficile de déterminer si les modifications observées sont les causes ou les conséquences du développement de l'asthme allergique (Vercelli, 2006). Cependant, une étude a montré que l'exposition de souris au *murid herpesvirus 4* (MuHV4), l'équivalent des gammaherpesvirus humains associés à une protection contre la sensibilisation aux IgE (Saghafian-Hedengren et al., 2010), confère une protection contre le développement d'asthme allergique à l'encontre d'extraits d'acariens (Machiels et al., 2017). En effet, l'infection au MuHV4 induit le remplacement des macrophages alvéolaires par des monocytes régulateurs, caractérisés par leur forte capacité à produire de l'IL-10. Ces monocytes régulateurs altèrent les CD4 pulmonaires et empêchent donc la sensibilisation allergique (Machiels et al., 2017). Des

altérations du microbiome intestinal influencent également l'apparition de l'asthme (Kalliomäki et al., 2001). D'un point de vue mécanistique, on sait que le microbiome intestinal joue un rôle important entre autres dans la production d'acides gras à chaînes courtes (AGCC) tels que le propionate ou le butyrate. Ces AGCC peuvent influencer le système immunitaire au niveau de l'intestin mais peuvent également passer la barrière intestinale et jouer un rôle systémique (Anand and Mande, 2018). En effet, les AGCC, en se liant aux récepteurs couplés à la protéine G, peuvent supprimer l'inflammation en induisant des lymphocytes T régulateurs (Arpaia et al., 2013) ou encore augmenter le développement de CD4 incapables d'induire des réponses immunitaires Th2 chez la souris (Trompette et al., 2014).

Enfin, l'exposition à un environnement riche en produits dérivés de bactéries, comme retrouvé dans les milieux ruraux par exemple, a été associée à une diminution de l'incidence des maladies atopiques et de l'asthme allergique (Adler et al., 2005; Braun-Fahrlander et al., 2002; Gehring et al., 2001, 2002; von Mutius and Vercelli, 2010). C'est cet aspect de l'hypothèse de l'hygiène qui sera plus amplement développé dans la suite de ce travail.

1.2.1.2 *L'effet ferme*

Les premières observations de Strachan consistaient en une association inversée entre le nombre d'enfants au sein d'une famille et la prévalence de rhume des foins et d'eczéma, deux désordres allergiques. Strachan en avait conclu qu'une diminution du nombre d'enfants entraînait une moindre transmission de pathogènes au sein de la fratrie et une augmentation du risque de développer des maladies allergiques (Strachan, 1989). Ces observations ont depuis lors été confirmées et étendues, en comparant des enfants vivant ou non dans des environnements particulièrement riches en agents pathogènes et leurs dérivés, à savoir des fermes. De nombreuses études ont démontré un effet protecteur important de la vie dans des fermes sur la sensibilisation allergique et le développement d'asthme, d'épisodes de dyspnée et d'atopies (Adler et al., 2005; Braun-Fahrlander et al., 1999; Radon et al., 2004; Riedler et al., 2000). La protection la plus importante a été reportée pour les enfants Amish, élevés dans des fermes traditionnelles, ces derniers présentant seulement 7,2% de sensibilisation allergique à des allergènes et aucun cas de rhume des foins en comparaison aux enfants Hutterite, élevés dans des fermes modernes industrialisées, très hygiéniques, montrent une très forte prévalence d'asthme (15%) et de sensibilisation allergique (40%) (Hrusch et al., 2015). Globalement, l'effet ferme contribuerait à une diminution de 25% du risque de développement d'asthme allergique (Genuneit et al., 2013). Différents facteurs peuvent expliquer l'effet protecteur des fermes : le contact avec le bétail et la nourriture du bétail (foin, grains, ensilage), ou encore la consommation de lait de vache cru, non pasteurisé. Ces facteurs contribuent indépendamment à l'effet protecteur des fermes, ce qui supporte que les deux principales voies d'exposition reposent sur l'inhalation et l'ingestion (von Mutius and Vercelli, 2010). De plus, la période d'exposition à ces facteurs constitue un élément-clé pour l'établissement de l'effet protecteur. En effet, une exposition dès les premières années de vie est cruciale (Braun-Fahrlander et

al., 1999). L'effet est encore plus important si l'exposition commence *in utero* via l'exposition de la mère aux animaux, aux travaux à l'étable lors de la grossesse (Ege et al., 2008), et est maintenue jusqu'à l'âge de 5 à 7 ans (Douwes et al., 2008). Enfin, la persistance de l'effet protecteur à l'âge adulte, plus difficile à évaluer, peut être maintenue (Leynaert et al., 2001; Radon et al., 2004) comme en témoigne, notamment, la forte augmentation des maladies atopiques en Pologne au cours des 9 années qui ont suivi son entrée dans l'Union Européenne et l'abandon de ses coutumes rurales (Sozańska et al., 2014). Les marqueurs généralement utilisés pour évaluer l'exposition aux agents microbiens environnementaux sont principalement les endotoxines ou LPS, composants de la paroi des bactéries Gram négatives. L'acide N-acétyl muramique (van Strien et al., 2004), composant du peptidoglycan présent sur la plupart des bactéries Gram positives et négatives, ainsi que des polysaccharides extracellulaires dérivés d'*Aspergillus sp* et *Penicillium spp* (Douwes et al., 2007) ont également été utilisés. Les taux d'endotoxines ont été inversement corrélés avec la prévalence de rhume des foins (Braun-Fahrlander et al., 2002), ainsi que d'asthme atopique et de sensibilisation allergique à un ou plusieurs allergènes (Gehring et al., 2002). Une exposition à des hauts taux d'endotoxines a également été associée à une diminution de la dermatite atopique (Gehring et al., 2001; Phipatanakul et al., 2004). Cependant, il est intéressant de noter que des niveaux élevés d'endotoxines peuvent constituer un facteur de risque pour l'asthme non-atopique, une diminution de la fonction pulmonaire (Douwes et al., 2002; Portengen et al., 2005) ainsi que pour les exacerbations chez les individus déjà asthmatiques (Michel et al., 1996).

Mécanisme de l'effet protecteur des fermes

D'un point de vue mécanistique, différentes hypothèses ont été avancées afin d'expliquer l'hypothèse de l'hygiène et l'effet protecteur d'une exposition aux micro-organismes ou à leurs dérivés. La première de ces hypothèses se base sur l'existence, au niveau des réponses immunitaires, d'une balance entre les réponses Th1 et Th2. Selon cette balance, une forte exposition aux micro-organismes induit une stimulation simultanée de plusieurs récepteurs innés, dont les TLRs, résultant en la synthèse d'IL-12 et d'IL-23 par les cellules du système immunitaire inné. La synthèse de ces cytokines engendre une augmentation du ratio Delta 4/jagged 1 au niveau des CD qui favorise la capacité des CD à polariser des lymphocytes T naïfs en lymphocytes Th1 (Amsen et al., 2004; Filì et al., 2006; Romagnani, 2004). Les réponses immunes Th1 induites et l'IFN- γ produit sont capables d'inhiber la production de cytokines Th2 et diminueraient ainsi le risque d'induction d'une réponse immunitaire Th2 et le développement de maladies allergiques. La perte de ce mécanisme protecteur suite à l'urbanisation de nos modes de vie et à la diminution de notre exposition aux micro-organismes est communément appelée « *missing immune deviation* ». Cette hypothèse est appuyée par l'existence d'une corrélation positive entre le taux d'endotoxines et les réponses de type 1 chez les enfants habitant dans des fermes (Lampi et al., 2011) ainsi que par l'augmentation de la synthèse d'IFN- γ dans le sang de cordon ombilical d'enfants dont les mères ont été exposées à des animaux et aux travaux à l'étable (Pfefferle et

al., 2010). Une augmentation de l'expression de différents *pattern recognition receptors* (PRRs), dont le TLR5 et le TLR9 (Roduit et al., 2011), le TLR2 et le CD14 (Ege et al., 2008), a également été observée chez les enfants ayant grandi dans des fermes, et ce, de manière dose-dépendante (Delayre-Orthez et al., 2004).

Néanmoins, d'autres observations vont plutôt à l'encontre de cette hypothèse. Tout d'abord, Braun-Fahrlander a démontré que les leucocytes d'enfants exposés à un environnement riche en micro-organismes et restimulés *ex vivo* montraient une diminution de la synthèse de cytokines telles que le TNF- α , l'IFN- γ , l'IL-10 et l'IL-12 (Braun-Fahrlander et al., 2002). Ensuite, de hauts niveaux de cytokines associées à une réponse Th1 sont retrouvés également chez les patients atteints d'asthme allergique et peuvent être associés à une aggravation des symptômes (Stephens et al., 2002), les individus sains ne possèdent pas plus de lymphocytes Th1 que les patients allergiques (Bacher et al., 2016) et cette hypothèse ne permet pas d'expliquer comment les infections parasitaires, puissants inducteurs des réponses immunes de type 2, induisent une protection contre l'induction de l'asthme allergique (Lambrecht and Hammad, 2017; von Mutius and Vercelli, 2010). Enfin, l'effet protecteur d'une exposition au LPS dans des modèles murins est caractérisé par une diminution des réponses de type 2, mais n'est pas systématiquement accompagné d'une augmentation des réponses de type 1 (von Mutius and Vercelli, 2010). Ces dernières observations plaident plutôt en faveur de l'implication de mécanismes immuno-régulateurs dans la protection à l'encontre de l'asthme allergique dans le contexte de l'hypothèse de l'hygiène.

Ces mécanismes immuno-régulateurs peuvent s'articuler autour de deux grands axes : d'une part, l'induction d'une « ignorance » face aux allergènes faisant intervenir des acteurs du système immunitaire inné, et d'autre part l'induction d'une tolérance spécifique par le biais de lymphocytes T régulateurs. En faveur de ces mécanismes tolérogènes, l'étude de Braun-Fahrlander évoquée ci-dessus montre une diminution de la synthèse de cytokines en réponse au LPS, telles que le TNF- α , l'IFN- γ , l'IL-10 et l'IL-12 par les leucocytes d'enfants exposés à des environnements « non hygiéniques » en comparaison à ceux provenant d'enfants exposés à de faibles taux d'endotoxines (Braun-Fahrlander et al., 2002). De plus, une exposition à de hauts taux de LPS peut entraîner une diminution de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 α et GM-CSF) par les CEPs (Schuijs et al., 2015). Finalement, nous avons démontré au sein de notre laboratoire, qu'une exposition à de l'ADN déméthylé riche en motifs CpG (CpG) conduisait à l'expansion de macrophages régulateurs (Mregs) dans le poumon. Les Mregs sécrètent d'importantes quantités d'IL-10, ayant pour effet d'inhiber l'activation des cellules dendritiques et le développement d'une réponse allergique (Bedoret et al., 2009; Sabatel et al., 2017). Une réponse immunitaire régulatrice spécifique de l'allergène pourrait également être impliquée. En effet, les enfants exposés à des produits microbiens sont pourvus d'un nombre plus élevé de lymphocytes T régulateurs dotés de propriétés d'inhibition des réponses T supérieures par rapport aux enfants non

exposés (Schaub et al., 2009). Par ailleurs, Akbari et al. ont montré, dans un modèle murin, qu'un challenge avec un allergène pouvait induire la synthèse d'IL-10 par les CD, favorisant ainsi le développement de lymphocytes T régulateurs (Akbari et al., 2001). Afin de concilier ces différentes hypothèses, Von Mutius et Vercelli ont proposé un modèle de l'immunobiologie de l'effet « ferme » (Figure 5) (von Mutius and Vercelli, 2010). L'exposition à une diversité importante d'agents pathogènes et de leurs produits dérivés, lors de la grossesse, entrainerait une stimulation du système immunitaire inné accompagnée de la synthèse de TNF- α et d'IFN- γ (Pfefferle et al., 2010). Le TNF- α induirait le développement de lymphocytes T régulateurs. Ces lymphocytes T régulateurs inhiberaient les réponses immunes Th2 et la sécrétion d'IL-4, d'IL-13 et la production d'IgE. Le fait que les réponses Th2 soient inhibées aurait des effets positifs sur l'expression de certains composants de PRRs sur les CD notamment, comme le CD14, ce qui constituerait une boucle auto-amplificatrice sur le nombre de PRRs, l'amplitude de la réponse immunitaire innée et le maintien de l'inhibition de la réponse Th2 (Cosentino et al., 1995; Lauener et al., 1990). Enfin, l'IFN- γ , de source non définie, et l'IL-12 sécrétée par les CD en réponse aux micro-organismes favoriseraient le développement de réponses immunitaires de type 1 au détriment des réponses de type 2 (Debarry et al., 2007).

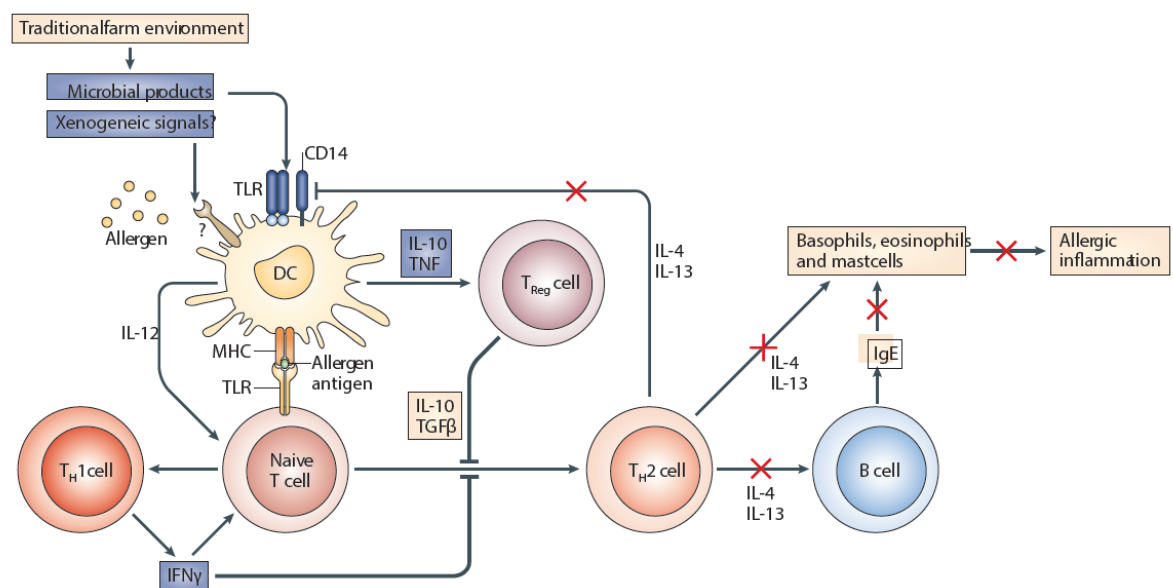
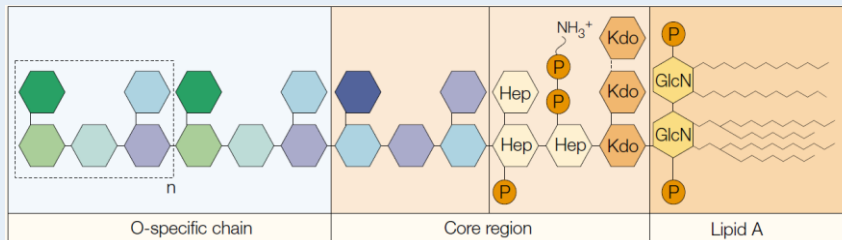


Figure 5 Modèle d'immunobiologie de l'« effet ferme ». Une exposition aux produits microbiens stimule la synthèse d'IL-10 et de TNF par les cellules dendritiques. L'IL-10 et le TNF entraînent la formation de lymphocytes Treg qui inhibent le développement de lymphocytes Th2. L'inhibition des lymphocytes Th2 permet l'augmentation du nombre de PRRs à la surface des cellules dendritiques, amplifiant ainsi la réponse immunitaire innée. L'IL-12 et l'IFN- γ favorisent le développement de lymphocytes de type Th1 au détriment de l'induction d'une réponse Th2. D'après (von Mutius and Vercelli, 2010)

Mécanisme de l'effet protecteur des fermes : cas particulier du LPS

Plusieurs produits dérivés des agents microbiens peuvent expliquer l'effet protecteur conféré par les fermes. Parmi ces produits, le LPS (BOX 4) reste néanmoins le marqueur le plus largement utilisé dans les études épidémiologiques, souvent corrélé à une protection à l'encontre de l'induction de l'asthme allergique (Braun-Fahrlander et al., 2002; Hofer, 2016). Récemment, la corrélation entre les taux de LPS et la prévalence de l'asthme a à nouveau été mise en lumière. En effet, des différences importantes de la prévalence d'asthme et de la sensibilisation allergique entre deux populations d'agriculteurs américains, les Amish et les Hutterite, partageant les mêmes origines et styles de vie mais utilisant des techniques agricoles diamétralement opposées, ont été depuis longtemps observées mais restaient inexplicables. Stein et al. ont investigué comment l'effet ferme des Amish pouvait contribuer à une protection à l'encontre de l'asthme contrairement aux fermes Hutterite. Pour se faire, les poussières des habitations des deux populations ont été récoltées et analysées. La quantité d'allergènes présents dans les poussières des domiciles était identique dans les deux communautés, par contre, les taux de LPS étaient 6,7 fois plus importants chez les Amish que chez les Hutterite (Stein et al., 2016). De plus, l'exposition de souris aux poussières des habitations Amish suffisait à octroyer une protection contre le développement de l'asthme allergique dans un modèle basé sur la sensibilisation à l'ovalbumine (OVA)-Alun, contrairement aux poussières provenant des maisons des Hutterite (Stein et al., 2016). Cet effet protecteur était aboli chez des souris déficientes pour *Myd88* et *Trif*, deux molécules impliquées dans la signalisation en aval de nombreux PRRs du système immunitaire inné. Afin d'investiguer le mécanisme protecteur, les auteurs ont caractérisé les cellules immunitaires innées des deux communautés. Des différences ont été identifiées au niveau des neutrophiles, présentant une surexpression des marqueurs CXCR4, CD11b et CD11c chez les Hutterite ainsi qu'au niveau des monocytes, montrant une augmentation de HLA-DR (équivalent du MHC-II de la souris) et une diminution de ILT3 chez les Hutterite (Stein et al., 2016). D'autre part, Eisenbarth et collègues avaient montré que si l'exposition de souris à de l'OVA seule n'induisait aucune réponse, l'association de l'OVA à de faibles doses de LPS (100ng) induisait une réponse de type Th2, tandis que l'exposition à de l'OVA couplée à de fortes doses de LPS (100µg) induisait préférentiellement une réponse immune Th1 (Eisenbarth et al., 2002). Enfin, l'exposition de souris naïves à de fortes doses de LPS confère une protection contre le développement de l'asthme envers des extraits d'acariens suite à la surexpression d'un facteur de transcription particulier par les CEPs, A20 ou *tntaip3*. Ce facteur de transcription régule négativement la voie de signalisation de NFκB et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires qui en découlent (IL-1α, GM-CSF et CCL20). La réduction de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires diminue le recrutement et la maturation des CD_s pulmonaires et donc la sensibilisation allergique (Schuijs et al., 2015).

BOX 4. Le LPS est un des composants lipidiques majeurs de la membrane externe des bactéries Gram négatives. Il est composé de trois parties : le lipide A, le cœur et l'antigène O. Le lipide A est extrêmement hydrophobique et constitue la partie toxique du LPS. Il est composé d'un disaccharide phosphorylé de glucosamine associé à des chaînes d'acides gras (jusqu'à 4 par groupement ester). Le cœur, est un oligosaccharide, lié au lipide A et composé de sucres tels que des hexoses (glucose, galactose, N-acétylglycosamine, N-acétylgalactosamine) pour sa partie externe et d'autres moins fréquents pour sa partie interne. L'antigène O est la partie la plus variable du LPS et est constituée de sous-unités oligosaccharidiques répétées de 2 à 40 fois (Erridge et al., 2002; Richter et al., 2011). Le LPS est reconnu par le système immunitaire et les cellules épithéliales via l'interaction entre le lipide A et le TLR4. L'intensité de l'activation du TLR4 peut varier en fonction du nombre de chaînes d'acides gras composant le lipide A, les chaînes longues étant les plus puissants stimulants (Netea et al., 2002).



Enfin, le LPS peut acquérir différentes formes dans un milieu hydrophile et ce, en fonction de sa concentration (Bergstrand et al., 2006) .

1.2.2 Infections virales respiratoires

Les infections virales respiratoires ont depuis des décennies été étroitement associées à la susceptibilité à l'asthme allergique et ce, à au moins deux niveaux : l'induction de l'asthme allergique chez les enfants en bas âge et les exacerbations d'asthme préexistant aussi bien chez les enfants que les adultes (Busse et al., 2010a; Sly et al., 2010). Les principaux virus impliqués sont des pathogènes des voies aériennes profondes responsables d'épisodes de dyspnée, comme le virus respiratoire syncytial (RSV), le rhinovirus (RV), les métapneumovirus, les coronavirus ainsi que les virus parainfluenza et influenza (Busse et al., 2010b; Mikhail and Grayson, 2019). Le RSV et le RV représentant les deux sources les plus fréquentes de dyspnée chez les jeunes enfants (en-dessous de 3 ans), leurs rôles dans le développement de l'asthme a été étudié en détail au niveau épidémiologique (Kotaniemi-Syrjänen et al., 2003; Rosenthal et al., 2010). Entre autres, Sigurs et collègues, dans une étude de cohorte d'enfants suivis jusqu'à leurs 18 ans, ont démontré une importante augmentation de l'asthme et de la sensibilisation allergique chez les enfants ayant souffert de bronchiolites induites par le RSV (Sigurs et al., 2010). De plus, une autre étude a montré que les enfants nés trois mois avant la saison des infections au RSV présentaient un risque plus important d'infection et un haut risque de développement d'asthme allergique à l'âge de 4 à 5 ans (Wu et al., 2008). Par ailleurs, on estime que 60% des enfants souffrant de dyspnée respiratoire due à une infection au RV durant leurs 2 premières années de vie développeront de l'asthme allergique au cours de leur vie (Kotaniemi-Syrjänen et al., 2003). L'association des

infections au RV et le développement de l'asthme allergique a été également récemment démontrée dans une méta-analyse se basant sur 15 études indépendantes (Liu et al., 2017a). De plus, le RV est étroitement associé à l'induction d'asthme allergique (Jackson et al., 2012), en présence ou non de sensibilisation allergique concomitante (Lukkarinen et al., 2017). Enfin, le risque d'asthme allergique est drastiquement augmenté (supérieur à un facteur 2) lors d'infections virales respiratoires (RV et RSV) conjointes à une sensibilisation allergique (Jackson et al., 2008; Kusel et al., 2007). Cependant, cette association n'est pas observée dans toutes les études. Poorisrisak n'observe aucun effet des infections virales respiratoires sur l'induction de l'asthme dans une cohorte de jumeaux (Poorisrisak et al., 2010). Aussi, Jackson et Chawes proposent que les infections virales respiratoires soient la conséquence d'une prédisposition génétique à l'asthme allergique et non sa cause (Chawes et al., 2012; Jackson et al., 2012).

Cette dernière observation est la source d'un débat toujours bien présent au sein de la communauté scientifique : les infections virales sont-elles réellement un facteur de risque de développement de l'asthme allergique ou une prédisposition génétique à l'asthme rend-elle certains enfants plus susceptibles aux infections virales respiratoires ? La question reste ouverte, mais certaines indications semblent appuyer un réel lien de cause à effet entre les infections virales et l'apparition de l'asthme. En effet, Simoes et collègues ont démontré que le traitement d'enfants prématurés au palivizumab, un anticorps monoclonal dirigé contre le RSV, permettait une réduction de 61% des symptômes asthmatiques durant la première année de vie et ce principalement chez des enfants ne présentant pas d'histoire familiale d'atopie (Simoes et al., 2007). De plus, de nombreux modèles murins démontrent l'augmentation de la sensibilisation allergique et le développement d'asthme allergique suite à différentes infections virales respiratoires (Al-Garawi et al., 2011; Cheung et al., 2010; Holt et al., 1988; Kim et al., 2012). Néanmoins, les deux scénarios ne sont pas exclusifs et pourraient dépendre de la souche virale et de la population considérée (à risque ou non) (Beigelman and Bacharier, 2013).

Les études épidémiologiques concernant les autres virus respiratoires sont beaucoup plus rares. Ceci pourrait s'expliquer par un manque de méthodes de détection et de techniques diagnostiques pour ces autres virus. En effet, une étude récente a démontré que seulement 28% des enfants en général et 43% des enfants admis aux soins intensifs souffrant d'une infection au virus influenza étaient réellement diagnostiqués pour ce virus, mettant ainsi en lumière une importante sous-estimation des infections à ce virus (Poehling et al., 2006).

Enfin, une étude de Bonnelyke et collègues remet en cause l'importance de la nature de la souche virale dans la susceptibilité à l'asthme. Dans cette étude, les auteurs ont investigué l'influence de différentes infections virales (RV, RSV, picornavirus, parainfluenza, influenza, pneumovirus) mais aussi bactériennes sur l'apparition d'asthme allergique. Les auteurs ont évalué le risque d'apparition d'asthme en corrigeant leurs tests statistiques en fonction du nombre d'épisodes infectieux expérimentés par les patients. Cette dernière correction a annulé toute association entre les infections et l'induction

d'asthme, démontrant ainsi une corrélation positive entre le nombre d'infections respiratoires, et non la nature de l'agent infectieux, et l'induction d'asthme allergique (Bønnelykke et al., 2015).

1.2.2.1 *Le virus influenza*

Le virus influenza est un virus enveloppé à acide ribonucléique (ARN) simple brin, segmenté, de polarité négative, faisant partie de la famille des *Orthomyxoviridae* et divisé en trois genres : A, B ou C (Arias et al., 2009). Le virus influenza A représente le genre le plus important d'un point de vue épidémiologique, peut infecter l'homme et a été à l'origine de quatre épisodes pandémiques à ce jour (Fukuyama and Kawaoka, 2011). Au niveau de sa structure, il est caractérisé par la présence à sa surface d'une hémagglutinine, une neuraminidase et la protéine M2. Il existe 16 hémagglutinines différentes et 9 neuraminidases permettant de discriminer les différentes souches d'influenza A (Arias et al., 2009). Le génome du virus est composé de huit segments d'ARN de polarité négative. Ces huit segments sont associés à une nucléoprotéine (NP) pour former le complexe ribonucléoprotéique. Les segments codent pour 10 protéines différentes : hémagglutinine, neuraminidase, protéine M2, protéine M1, complexe polymérase (PB1, PB2, PA), nucléoprotéine, protéines non structurales (NS1 et NS2) (Arias et al., 2009; Julkunen et al., 2001) (Figure 6 A).

Le virus se lie aux cellules épithéliales de l'hôte via la reconnaissance d'un acide sialique à la surface de ces dernières par l'hémagglutinine virale. L'entrée du virus dans la cellule peut se faire par différents processus : puits de clathrines, cavéoles ou macropinocytose. La protéine M2, fonctionnant comme un canal ionique, engendre un flux de H^+ dans l'endosome. Le pH acide de l'endosome permet un changement de conformation de l'hémagglutinine qui se divise en deux sous-unités : HA1 et HA2. HA2 entraîne la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane de l'endosome (Arias et al., 2009).

Une fois libéré dans le cytoplasme, le complexe ribonucléoprotéique est transporté dans le noyau de la cellule hôte. La réplication et la synthèse de nouvel ARN viral se produisent dans le noyau cellulaire. Une fois le cycle de réplication terminé, les nouveaux complexes ribonucléoprotéiques quittent le noyau et migrent vers la membrane cytoplasmique où ils s'assemblent avec les autres protéines virales pour former de nouveaux virions. Enfin, la neuraminidase permet le bourgeonnement et la libération des virions (Arias et al., 2009; Julkunen et al., 2001) (Figure 6B).

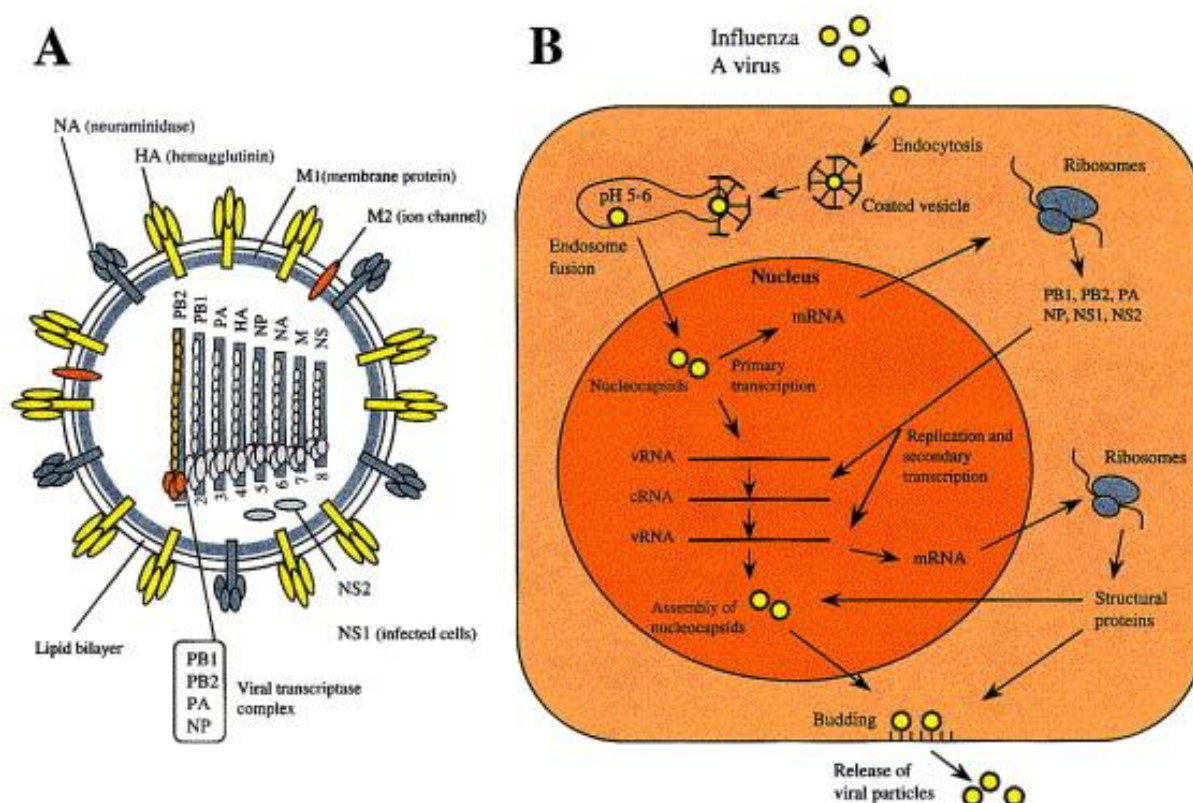


Figure 6. Structure et cycle du virus influenza A H1N1 A) Le virus influenza A est un virus enveloppé. Il contient trois protéines à sa surface : l'hémagglutinine, la neuraminidase et la protéine de matrice M2. Sous la bicouche lipidique, se trouve une couche protéique constituée de la protéine de matrice M1. La matrice contient le génome viral, constitué de huit segments d'ARN simple brin de polarité négative ainsi que la protéine non structurale NS2. B) Le virus influenza entre dans la cellule par différents types d'endocytose. Le pH acide de l'endosome entraîne la libération du complexe ribonucléoprotéique dans la cellule. La réplication virale se réalise dans le noyau cellulaire. Une fois les différents composants du virus synthétisés, les nouveaux virions sont relargués dans l'espace inter-cellulaire. D'après (Julkunen et al., 2001)

Seules quelques études expérimentales ont investigué le rôle du virus influenza dans l'induction de l'asthme allergique chez la souris. Toutes ces études aboutissent à la même conclusion, à savoir que le virus influenza provoque une augmentation de la sensibilisation allergique et le développement subséquent d'asthme. En effet, l'exposition à des allergènes de divers types comme les extraits d'acariens (Al-Garawi et al., 2011, 2009), l'albumine de sérum bovin (Sato et al., 2009), l'ovalbumine complémentée à de l'hydroxyde d'aluminium (Holt et al., 1988; Suzuki et al., 1998; Yamamoto et al., 2000, 2001) ou l'hémocyanine de patelle (Dahl et al., 2004) consécutivement à une infection au virus influenza conduit à une inflammation éosinophilique, une hyperréactivité bronchique, la synthèse de cytokines de type Th2 (IL-4, IL-5 et IL-13, de manière inconstante) et la sécrétion d'anticorps spécifiquement dirigés contre l'allergène. De plus, une infection au virus influenza altère l'induction de la tolérance à un allergène comme l'ovalbumine (Tsitoura et al., 2000). Cependant, une étude observe un effet protecteur d'une infection au virus influenza sur le développement d'une réponse Th2 à

l'encontre de l'ovalbumine (Wohlleben et al., 2003). Cette observation contradictoire peut être expliquée par l'importance du timing d'exposition à l'allergène par rapport à l'infection virale. En effet, plusieurs groupes indépendants ont démontré que si une exposition à l'allergène au cours de la phase aiguë de l'infection (selon les modèles, du 3^{ème} jour au 8^{ème} jour suivant l'inoculation virale) favorise bien l'initiation d'une réponse Th2 à l'encontre de l'allergène, l'exposition au même allergène lors de la phase de récupération de l'infection virale confère une certaine protection contre le développement de réponses immunitaires à l'encontre de l'allergène (Al-Garawi et al., 2009; Yamamoto et al., 2001). Toutefois, Dahl et collègues observent constamment une augmentation de la réponse Th2 à l'encontre de l'hémocyanine de patelle et ce y compris lors d'une exposition après la phase de récupération de l'infection virale (30 jours post-infection) (Dahl et al., 2004).

Le mécanisme d'augmentation de la sensibilisation allergique par l'infection virale semble reposer sur l'activation des cellules présentatrices d'antigène suite à l'infection virale. En effet, Yamamoto et collaborateurs ont observé une augmentation de l'expression de MHC-II et de la capture de l'antigène (OVA) par les CD des souris exposées au virus influenza (Yamamoto et al., 2001). Brimnes et Dahl ont montré une augmentation des molécules de co-stimulation (CD80 et CD86) et du MHC-II par les CD suite à une infection par le virus influenza ainsi qu'une augmentation de l'induction de cellules effectrices Th1 et Th2 (Dahl et al., 2004) ou la prolifération de lymphocytes OT-I et OT-II (Brimnes et al., 2003) lors d'expériences *in vivo* et *in vitro* (Brimnes et al., 2003; Dahl et al., 2004). De plus, Dahl et al. ont démontré que la maturation des CD dépendait de l'IFN- γ sécrété lors de la phase aiguë de l'infection virale (Dahl et al., 2004). Enfin, Al-Garawi et al. ont également étudié l'impact d'une infection virale ou d'une exposition aux extraits d'acariens sur le poumon de jeunes souriceaux. Contrairement aux adultes, l'administration d'extraits d'acariens à des souriceaux n'induit pas de réponse immunitaire à l'encontre de l'allergène mais bien une forte sécrétion des cytokines immunorégulatrices TGF- β et IL-10. Cependant, l'exposition aux extraits d'acariens suite à une infection virale respiratoire entraîne une forte réponse Th2 à l'encontre de ces extraits chez les souriceaux (Al-Garawi et al., 2011). L'infection virale entraîne une augmentation de l'expression des TLRs (en particulier le TLR4), le recrutement de moCDs, de pCDs et de monocytes classiques Ly6C⁺. De manière intéressante, le recrutement de moCDs est également observé chez des souris adultes en réponse à des extraits d'acariens seuls, capables dans ce cadre d'induire une réponse Th2. Enfin, l'exposition au virus influenza induit la sécrétion de cytokines Th1 et Th2 ainsi que la libération d'alarmines (IL-25, IL-33, TSLP, GM-CSF) par les cellules épithéliales dans le poumon des souriceaux. Ces résultats suggèrent que l'exposition au virus influenza instaure, dans le poumon, un climat propice au développement de réponses allergiques, du moins chez des souriceaux (Al-Garawi et al., 2011).

1.2.3 Pollution aérienne

L'urbanisation et l'industrialisation des pays occidentaux ont engendré une forte augmentation de la pollution de l'air ambiant dans les zones urbaines. Les polluants aériens les plus fréquents sont le dioxyde d'azote (NO_2) et l'ozone (O_3), produits dérivés du trafic urbain, mais aussi le dioxyde de soufre (SO_2) dans les zones industrielles (D'Amato et al., 2002). On estime, actuellement, que la pollution de l'air contribue à 3% de l'espérance de vie corrigée pour l'incapacité (ou DALY, *Disability Adjusted Life Years*) (Guarnieri and Balmes, 2014). En d'autres mots, 3% des années de vie perdues pour incapacité physique sont dus à un effet des polluants aériens. De plus, 14% des nouveaux cas d'asthme sont attribués à la pollution de l'air causée par le trafic (Perez et al., 2013).

Plusieurs études épidémiologiques ont démontré un lien entre la pollution aérienne et l'exacerbation de l'asthme chez les patients asthmatiques (Alexis and Carlsten, 2014). De nombreuses évidences pointent également une contribution importante des polluants aériens (NO_2 , particules fines et O_3) dans l'induction de nouveaux cas d'asthme (Dong et al., 2011; Jacquemin et al., 2012; Jerrett Michael et al., 2008; Nishimura et al., 2013; Zu et al., 2018). Néanmoins, l'air ambiant représentant un mélange complexe de polluants, l'évaluation de l'effet individuel de chaque polluant peut se révéler difficile (Guarnieri and Balmes, 2014).

1.2.3.1 Ozone

L'ozone (O_3) est un composant naturel de la stratosphère où il joue un rôle vital dans la protection des organismes contre les rayons ultraviolets solaires. Au niveau de la troposphère, il est considéré comme un polluant secondaire formé à partir de deux précurseurs principaux : les composés organiques volatils et le dioxyde d'azote, lors de leur interaction avec les rayons ultraviolets du soleil. L'ozone représente donc un des composants majeurs du « summer smog ». Les sources des précurseurs de l'ozone peuvent être d'origine naturelle, comme l'émission par la végétation, les micro-organismes ou les animaux, ou provenir de la combustion de la biomasse (émissions industrielles, solvants chimiques, échappements des véhicules) (Nuvolone et al., 2018). Les concentrations d'ozone dans l'air varient fortement selon la saison et la zone géographique, avec les plus fortes concentrations atteintes pendant les mois d'ensoleillement important, principalement dans les pays du sud de l'Europe. Selon les directives de la qualité de l'air ambiant de 2008, la concentration en ozone ne doit pas dépasser $120 \mu\text{g}/\text{m}^3$ sur une base de 8 heures d'exposition et ce pas plus de 25 jours par an. En 2014, l'Agence Européenne de l'Environnement estimait que 8% de la population européenne avait été exposée à des concentrations d'ozone dépassant les directives de $120 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (Nuvolone et al., 2018).

L'impact de l'ozone sur l'induction de l'asthme a été investigué selon deux critères principaux : la chronicité de l'exposition (exposition aiguë ou prolongée) et le moment de la vie auquel cette

exposition a eu lieu (*in utero*, durant la petite enfance ou à l'âge adulte). Concernant l'exposition *in utero*, seule une étude a observé une corrélation positive entre l'ozone et le développement consécutif de l'asthme chez des enfants en âge d'aller à l'école (Sbihi et al., 2016). D'autres études n'ont observé aucun effet, voire une corrélation négative, entre l'ozone et l'induction de l'asthme (Zu et al., 2018).

Une exposition aiguë chez les enfants a, par contre, été associée au développement de l'asthme (Dong et al., 2011; Tétreault Louis-Francois et al., 2016) et plus particulièrement à une augmentation de la sensibilisation allergique aux allergènes extérieurs (Kim et al., 2011). Cette augmentation est encore plus importante durant les mois d'été, associés à un fort ensoleillement (Lin Shao et al., 2008; Tétreault Louis-Francois et al., 2016) ou lorsqu'elle est associée à un exercice physique (McConnell et al., 2002).

Une exposition à long terme (10 à 15 ans), à de fortes concentrations, 60 à 200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ en moyenne par an sur base d'une exposition de 8 heures par jour (Abbey D E et al., 1991; Greer et al., 1993) chez les adultes non-fumeurs a été corrélée à l'apparition de nouveaux cas d'asthme se développant à l'âge adulte (Jacquemin et al., 2012; McDonnell et al., 1999). Les hommes semblent présenter un plus grand risque de développer de l'asthme suite à des expositions à l'ozone que les femmes (Abbey D E et al., 1991; Greer et al., 1993).

Ces observations ont été corroborées par des études expérimentales menées entre autres sur des macaques (Schelegle et al., 2003), des cochons d'Inde (Matsumura, 1970; Sumitomo et al., 1990), des souris (Hollingsworth et al., 2010; Neuhaus-Steinmetz et al., 2000; Osebold et al., 1980) ou des rats (Koike and Kobayashi, 2004). Quel que soit l'espèce ou le design expérimental, ces études observent toutes une augmentation de la sensibilisation allergique et de différents paramètres des réponses immunitaires Th2 lorsque la sensibilisation est précédée ou administrée conjointement à une exposition à l'ozone. D'un point de vue mécanistique, Hollingsworth et collègues ont rapporté que cette potentialisation de la sensibilisation allergique est absente chez des souris déficientes en TLR4, suggérant ainsi un rôle prépondérant de ce dernier dans les effets observés (Hollingsworth et al., 2010). En effet, le TLR4 pourrait être activé par certains produits dérivés de l'action de l'ozone comme le glycosaminoglycan ou l'acide hyaluronique (Al-Hegelan et al., 2011). De plus, plusieurs études ont rapporté un effet de l'ozone sur les cellules présentatrices d'antigène pulmonaires. Hollingsworth et collègues ont observé une augmentation de l'expression de CD86 à la surface des CD suite à une exposition à l'ozone. Cependant, les auteurs de cette étude n'ont pas observé de migration des CD vers le noeud lymphatique drainant suite à une exposition à l'ozone, ni une augmentation d'autres marqueurs de maturation tels que le MHC-II, le CD40 ou le CD80 (Hollingsworth et al., 2010). Néanmoins, Koike et al. ont trouvé une augmentation de la capacité d'induction de la prolifération de lymphocytes T provenant de souris sensibilisées à l'ovalbumine par des CD pulmonaires provenant de souris exposées à l'ozone en comparaison à celles provenant de souris exposées à l'air, dans des modèles de co-culture.

Dans leur modèle, l'exposition à l'ozone augmentait significativement le nombre de cellules pulmonaires positives pour MHC-II et CD11b (Koike and Kobayashi, 2004). Au contraire, dans un modèle de transfert adoptif de CD⁺ dérivées de la moëlle osseuse (*bone marrow-derived DCs* ou BMDCs) pulsées à l'ovalbumine à des souris naïves, exposées ou non à de l'ozone, Depuydt et collègues, n'ont observé aucun effet de l'exposition à l'ozone sur l'activité des BMDCs transférées et le développement de l'allergie respiratoire. En revanche, si l'exposition à l'ozone est appliquée lors de la phase de challenge à l'ovalbumine, 14 jours après l'instillation de BMDCs pulsées, les souris exposées à l'ozone montraient une augmentation de l'inflammation allergique. Ces résultats divergents pourraient être dus à des variations importantes, d'un facteur 10, de la concentration d'ozone administrée (Depuydt et al., 2002). Il est intéressant de noter que, en accord avec les études épidémiologiques, une étude murine n'a pas pu montrer de corrélation positive entre l'exposition de souris gestantes et une susceptibilité plus importante à développer de l'asthme par les souriceaux (Sharkhuu et al., 2011). Enfin, l'ozone à lui seul peut induire une inflammation pulmonaire similaire à celle observée lors de réactions allergiques, caractérisée par une infiltration éosinophilique, une augmentation du mucus, la sécrétion d'IL-13 et une hyperréactivité bronchique. Cette inflammation est indépendante de l'activation du système immunitaire adaptatif (Kumagai et al., 2017) et principalement due à un recrutement et une activation des ILC2s (Kumagai et al., 2017; Yang et al., 2016b) en réponse à la synthèse d'IL-33 par les cellules épithéliales (Yang et al., 2016b). Enfin, les cellules T *natural killer* et l'IL-17 pourraient également être impliquées dans l'hyperréactivité bronchique suite à une exposition à l'ozone seul (Pichavant et al., 2008).

1.3 Les neutrophiles

1.3.1 Généralités

C'est sous le microscope de Paul Ehrlich, en 1880, que sont observés pour la première fois les neutrophiles (Jablonska and Granot, 2017). Ces cellules de 7 à 10 µm de diamètre ont la particularité de présenter un noyau segmenté et un cytoplasme enrichi en granules et vésicules sécrétoires (Borregaard, 2010). Les neutrophiles représentent 10 à 25 % des leucocytes sanguins totaux de la souris et 50 à 70% de ceux de l'humain (Doeing et al., 2003; Mestas and Hughes, 2004). On estime leur production quotidienne, chez l'homme, à un billion par kilo de poids vif. Cette dernière peut augmenter d'un facteur dix lors d'épisodes inflammatoires (Ley et al., 2018).

Les neutrophiles ont longtemps été considérés comme des cellules à très courte durée de vie, avec une demi-vie de 6 à 8 heures chez l'homme (Summers et al., 2010). Pourtant, une étude récente basée sur un labelling *in vivo* des neutrophiles chez l'humain et la souris a révélé une durée de vie des neutrophiles, en conditions d'homéostasie, de 5,4 jours chez l'humain et 18 heures chez la souris (Pillay

et al., 2010). Cette durée de vie est, par ailleurs, augmentée lors d'inflammation et peut atteindre 48 heures chez la souris (Wang et al., 2017).

1.3.2 Origine

La production de neutrophiles constitue une des activités majeures de la moëlle osseuse, dont les cellules sont pour 50 à 60% d'entre elles, des neutrophiles (EDWARDS, 1994). En réponse au *granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF), les cellules souches hématopoïétiques, localisées au niveau des niches formées par les ostéoblastes, passent du stade progéniteur myéloïde commun à celui de progéniteur de monocytes-granulocytes (GMP) pour aboutir aux neutrophiles différenciés (Borregaard, 2010). Jusqu'il y a peu, la trajectoire entre le stade GMP et le neutrophile différencié mature était peu définie. En 2018, un précurseur hautement prolifératif a été identifié juste après le stade GMP, le preNeu. Le preNeu se différencie ensuite en une population de neutrophiles immatures Ly-6G^{lo/+}CXCR2⁻ suivi de l'état final de neutrophiles matures Ly-6G^{hi}CXCR2⁺ (Evrard et al., 2018). La différenciation des progéniteurs myéloïdes communs en neutrophiles matures prend en moyenne dix jours et dépend de différents facteurs de transcription tels que PU.1, *CCAAT enhanced binder protein α* (C/EBPα), *Growth factor independence 1* (GFI 1) et C/EBPε (Ley et al., 2018). Le nombre de neutrophiles produits est régulé en fonction du nombre de neutrophiles apoptotiques phagocytés par les macrophages tissulaires résidents et dépend de l'axe IL-23/IL-17/G-CSF. Les macrophages, suite à la phagocytose de neutrophiles apoptotiques, diminuent leur sécrétion d'IL-23, cette diminution entraîne une chute de la synthèse d'IL-17 par les cellules T γδ notamment. Il s'ensuit une diminution de la sécrétion de G-CSF et de la production des neutrophiles (Stark et al., 2005). Les neutrophiles peuvent également maturer en dehors de la moëlle. En effet, des progéniteurs immatures de neutrophiles ont été retrouvés dans différents tissus, dont la rate (Santo et al., 2010). Ce phénomène pourrait permettre aux progéniteurs de se différencier en plusieurs types de neutrophiles différents en fonction des signaux dérivés de leur environnement (Hidalgo et al., 2019).

1.3.3 Trafficking

La sortie des neutrophiles de la moëlle osseuse vers la circulation sanguine repose sur une balance entre l'expression de CXCR4 par les neutrophiles, la sécrétion de CXCL12 (le ligand de CXCR4) par les ostéoblastes (Katayama et al., 2006) et l'expression croissante de CXCR2 sur les neutrophiles matures (Eash et al., 2010). Dans un premier temps, l'axe CXCR4/CXCL12 permet de retenir les neutrophiles immatures au niveau de la moëlle osseuse. Au cours de leur maturation, les neutrophiles diminuent progressivement l'expression de CXCR4 et augmentent parallèlement leur expression de CXCR2, diminuant ainsi leur affinité pour la niche hématopoïétique. De plus, sous l'influx d'une augmentation de G-CSF et la libération de noradrénaline par le système nerveux sympathique, les

ostéoblastes diminuent fortement leur synthèse de CXCL12, libérant ainsi les neutrophiles matures dans la circulation sanguine (Katayama et al., 2006).

Les neutrophiles libérés dans le flux sanguin sont répartis en deux grands groupes : les neutrophiles circulants (49% des neutrophiles se trouvant dans la circulation) et le pool de neutrophiles marginés (51% des neutrophiles sanguins) (Summers et al., 2010). Le pool marginé est constitué de neutrophiles séquestrés au niveau du foie, de la rate et du poumon, directement mobilisables en cas d'inflammation. La biodistribution du pool marginé dépend du statut d'activation des neutrophiles. En effet, on retrouve principalement des neutrophiles matures au niveau du foie, des neutrophiles inflammatoires, induits par une stimulation au LPS, au niveau du foie et du poumon (Suratt et al., 2001) et aussi bien des neutrophiles matures qu'immatures dans la rate (Deniset et al., 2017). Le pool marginé de neutrophiles pulmonaires revêt d'un intérêt particulier. En effet, le poumon recevant l'entièreté du flux sanguin provenant du cœur, tous les neutrophiles y transitent obligatoirement sans particulièrement former un pool marginé. Dans ce sens, Summers et al. ont montré que les neutrophiles passaient en moyenne le même temps que les globules rouges dans le poumon (Summers et al., 2014). A l'inverse, plusieurs études ont observé une séquestration des neutrophiles dans le poumon d'une durée beaucoup plus longue que dans d'autres organes (Lien et al., 1987; Peters et al., 1985; Ussov et al., 1995). La possibilité d'un « entrappement » physique dû au très faible diamètre des capillaires pulmonaires pourrait expliquer ce délai de passage plus long au niveau du poumon. Cependant, une étude basée sur l'utilisation de microscopie intravitale a montré qu'un grand nombre de neutrophiles, présents au niveau du lit capillaire pulmonaire à l'état basal, présentait trois comportements différents au sein des capillaires : la fixation, le « *crawling* » et une ferme adhésion. Ces trois comportements suggèrent que ces neutrophiles restent de manière active dans les capillaires pulmonaires et ne sont pas simplement bloqués dans les petits vaisseaux (Kreisel et al., 2010).

Le recrutement des neutrophiles au sein de la plupart des tissus comprend une série d'étapes bien définies : la capture, le roulement, l'adhésion, le « *crawling* » et enfin la transmigration (Kolaczowska and Kubes, 2013). La capture s'initie lorsque les cellules endothéliales, suite à une stimulation par des cytokines sécrétées par des leucocytes ou la reconnaissance d'un signal de danger via les PRRs, commencent à exprimer à leur surface la P-sélectine, pré-stockée dans les corps de Weibel Palade. La E-sélectine est, quant à elle, synthétisée *de novo* et exprimée dans les 90 minutes suivant une stimulation (Ley et al., 2007). Ces sélectines interagissent avec les *P-selectine glycoprotéine ligand 1* (PSGL1) situées à la surface des neutrophiles. Les neutrophiles entament ensuite la phase de roulement. Lors du roulement, afin de résister aux contraintes d'arrachement du flux sanguin, les neutrophiles assurent une balance entre la formation, à l'avant, et la dissociation, à l'arrière, de leurs liens avec les cellules endothéliales. Les premiers ancrages entre sélectines et PSGL1 sont complétés, lors de la phase d'adhésion, par des interactions entre le *lymphocyte function-associated antigen 1* (LFA1) et les

récepteurs *Intercellular adhesion molecule* (ICAM)-1 et (ICAM)-2 des cellules endothéliales. Ces liaisons multiples permettent aux neutrophiles d'interagir avec des chimiokines à la surface des cellules endothéliales, induisant leur activation et le « *crawling* » ou ralentissement important jusqu'à l'arrêt total. Ces chimiokines, chargées positivement, créent un gradient de concentration le long du vaisseau sanguin, servant de guide pour les neutrophiles jusqu'au site de l'inflammation. En particulier, une étude récente a démontré que les chimiokines CXCL1 et CXCL2 agissaient de manière séquentielle et coordonnée, régulant différentes étapes du recrutement des neutrophiles, et ce, malgré leur interaction avec le même récepteur, le CXCR2. La sécrétion de CXCL1 est induite par le TNF- α et induit à son tour la sécrétion endogène de CXCL2 par les neutrophiles. CXCL2 interagit avec un récepteur particulier, *atypical chemokine receptor kinase 1* ou ACKR1, exprimé au niveau des jonctions entre les cellules épithéliales. Cette synthèse séquentielle permettrait aux neutrophiles de trouver l'endroit le plus approprié pour effectuer la transmigration et d'optimiser ainsi leur recrutement (Girbl et al., 2018). Une fois le neutrophile situé au bon endroit, la phase de « *crawling* » se poursuit par la transmigration ou passage au travers de l'endothélium. Les neutrophiles peuvent traverser l'endothélium au niveau des jonctions intercellulaires (passage para-cellulaire) ou au travers des cellules endothéliales (passage trans-cellulaire). Le passage para-cellulaire repose principalement sur les interactions entre ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1 au niveau des cellules endothéliales et leurs ligands LFA1, MAC-1 au niveau des neutrophiles (Liew and Kubes, 2019). Lors du passage trans-cellulaire, les cellules endothéliales forment des dômes, projections similaires à des microvillosités, qui enroulent le neutrophile pour former une cupule transmigatoire (Phillipson et al., 2008). Cette cupule transmigatoire permet d'isoler le neutrophile du compartiment intracellulaire et d'empêcher sa phagocytose. La portion basale de la cellule épithéliale forme ensuite un portail pour permettre au neutrophile de la traverser sans engendrer une perte excessive de plasma (Carman and Springer, 2004) (figure 7).

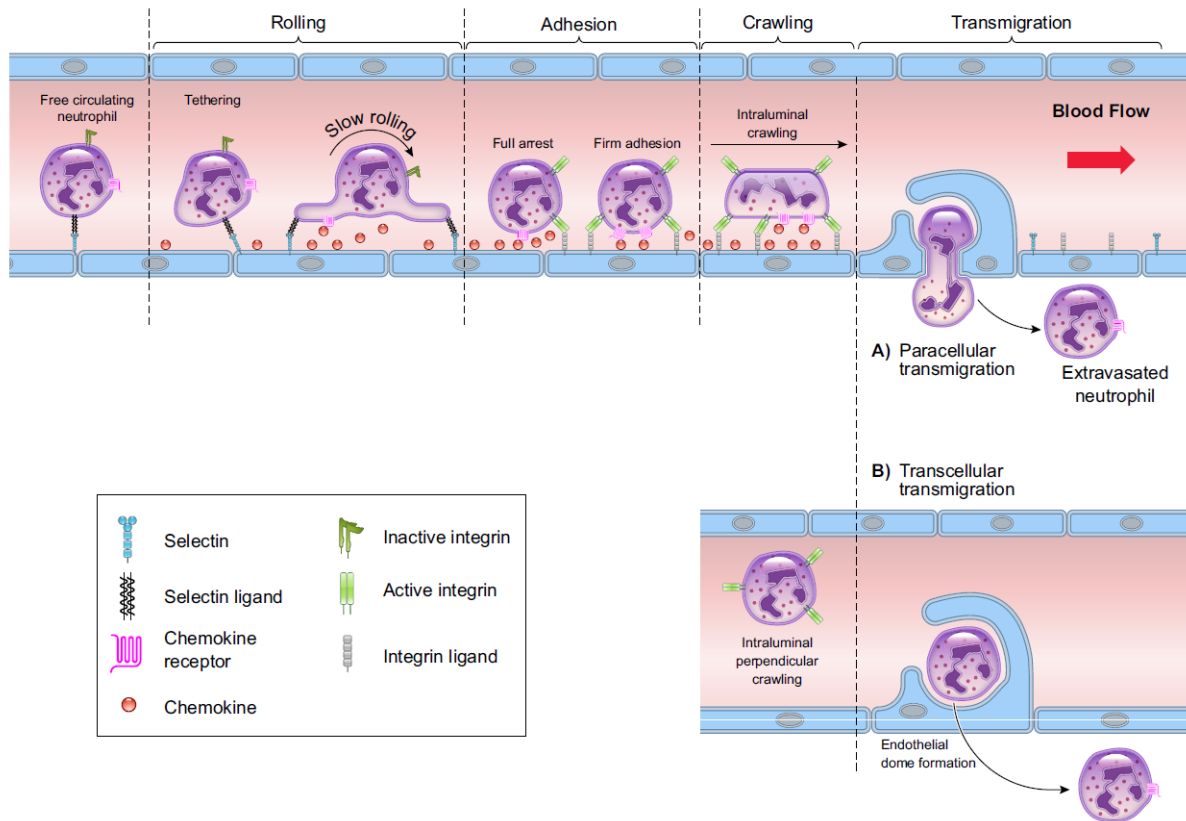


Figure 7. Recrutement tissulaire des neutrophiles. L'expression de sélectines par les cellules épithéliales activées entraîne la capture et l'initiation de la phase de roulement. L'activation d'intégrines entame la phase d'adhésion du neutrophile. Cette phase permet au neutrophile d'interagir avec les chimiokines tapissant le vaisseau sanguin. Lors de la phase de « crawling », le neutrophile suit le gradient de concentration des chimiokines jusqu'au site d'inflammation. Une fois sur place, il entame la transmigration par voie para-cellulaire ou trans-cellulaire. D'après (Liew and Kubes, 2019)

La voie d'élimination des neutrophiles n'est pas encore complètement élucidée. En cas d'inflammation, une partie des neutrophiles peut être évacuée via des sécrétions comme le pus ou l'urine en cas de cystite (Liew and Kubes, 2019). Chez l'homme, on estime également que 30,000 neutrophiles migrent au niveau de la bouche chaque minute, ce qui ne représente néanmoins qu'1% des neutrophiles totaux (Landzberg et al., 2015). La nuit, les neutrophiles nettoient la surface de l'œil et sont donc éliminés via ce compartiment externe (Postnikoff and Nichols, 2017). En conditions basales, un tiers des neutrophiles retournent au niveau de la moelle où ils sont évacués (Martin et al., 2003). En effet, des neutrophiles sénescents au niveau de la circulation expriment des hauts niveaux de CXCR4, favorisant leur retour au niveau de la moelle osseuse. Cependant, les neutrophiles provenant de souris déficientes pour CXCR4 montrent une durée de vie équivalente à ceux des souris contrôles sauvages (Eash et al., 2009), et les souris constitutivement déficientes pour CXCR4 au niveau des cellules myéloïdes exhibent une neutrophilie avec une libération augmentée des stades immatures, mais le lieu de leur élimination reste indéterminé (Martin et al., 2003). Les neutrophiles morts dans la circulation sanguine peuvent également être évacués au niveau du foie et de la rate, bien que les nouvelles technologies telles que

l'imagerie *in vivo* n'aient pas encore confirmé cette voie d'évacuation jusqu'à présent (Hong et al., 2012; Shi et al., 2001). En conditions inflammatoires, une partie des neutrophiles expriment des signaux « *eat me* » et sont phagocytés par les macrophages tissulaires. Cependant, l'absence de macrophages et de monocytes ne retarde pas la clairance des neutrophiles (Wang et al., 2017). Enfin, les neutrophiles entrés dans les tissus sont capables de retourner dans la circulation sanguine via un phénomène appelé « *reverse trans-migration* » (Nourshargh et al., 2016). Notamment, une étude a montré que suite à un dommage thermique au niveau du foie, les neutrophiles étaient capables de retourner dans la circulation sanguine pour ensuite transiter au niveau du poumon, où ils augmentent leur expression de CXCR4, leur permettant de retourner dans la moëlle pour y être évacués (Wang et al., 2017).

1.3.4 Fonctions

Les neutrophiles sont depuis longtemps considérés comme les premières cellules du système immunitaire inné recrutées au niveau des sites d'infection. Ils interagissent et interceptent les agents pathogènes via trois principaux mécanismes : la phagocytose, la libération de granules cytotoxiques et la libération de *neutrophil extracellular traps* ou NETs. Les neutrophiles jouent un rôle efficace dans la résistance contre les infections bactériennes (Easton et al., 2007; Pedrosa et al., 2000; Witter et al., 2016), virales (Fujisawa, 2001; Tate et al., 2011; Tumpey et al., 1996), parasitaires (Bliss et al., 2001; Peters et al., 2008; Velazquez et al., 1998) et fongiques (Feldmesser, 2006; Rodriguez et al., 2007). Ces dernières années, différents rôles dans les processus non infectieux, tels que la réparation tissulaire, le choc anaphylactique et le choc septique ont également été décrits. Enfin, il apparaît à présent clairement que les neutrophiles influencent et régulent les réponses immunitaires innées et adaptatives. Ce paragraphe abordera ces différentes fonctions, indépendamment de la formation de NETs, qui sera abordée plus largement dans le paragraphe suivant.

1.3.4.1 Rôle dans les processus infectieux : interactions avec les agents pathogènes

Phagocytose et explosion oxydative

Les neutrophiles sont également de puissants phagocytes. L'opsonisation des agents pathogènes et leur reconnaissance par les Fc récepteurs, les lectines de type C ou le complément entraînent l'initiation de la phagocytose de cet agent pathogène par le neutrophile (Dale et al., 2008). Après avoir internalisé l'agent pathogène, le phagosome fusionne avec les granules primaires et secondaires du neutrophile. Dans un même temps, le complexe *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* (NADPH) oxydase s'assemble et aboutit à la production de radicaux libres de l'oxygène et ses produits de réactions, aussi appelés formes réactives de l'oxygène (*reactive oxygen species*, ROS). La myéloperoxydase (MPO), une autre enzyme impliquée dans la production d'oxydants, engendre la production d'acide hypochloreux (Segal, 2005). La NADPH et les ROS jouent un rôle prépondérant dans la destruction des agents pathogènes comme en témoignent les patients atteints de la maladie

granulomateuse chronique, souffrant d'une déficience génétique en NADPH et qui présentent une grande sensibilité à des infections bactériennes et fongiques chroniques et résistantes (Song et al., 2011).

Dégranulation

Les neutrophiles possèdent une quantité importante de granules cytoplasmiques. Ces granules peuvent être subdivisés en quatre groupes, en fonction de leur ordre de formation. (1) Les granules azurophiliques ou primaires, composés, entre autres, de la MPO, la cathepsine G, la neutrophile élastase (NE), la protéinase 3 (PR3) et de défensines ; (2) les granules secondaires ou spécifiques contenant la lactoferrine et d'autres chélateurs du fer ou du cuivre ainsi que le cytochrome b₅₅₈; (3) les granules tertiaires contenant des gélatinases comme la MMP-9 et (4) les vésicules sécrétoires contenant, entre autres, l'albumine et diverses cytokines (Faurschou and Borregaard, 2003; Sheshachalam et al., 2014). Lors de la dégranulation, ces granules sont libérés dans le milieu extracellulaire selon un ordre précis : les vésicules sécrétoires, les granules tertiaires, les granules secondaires et enfin, les granules primaires (Sengeløv et al., 1993). Une faible stimulation, suffisante pour augmenter l'expression de MAC-1 et CXCR2, suffit à mobiliser les vésicules sécrétoires. Les granules tertiaires et secondaires sont libérés si la stimulation est maintenue et se renforce, tandis que les granules primaires nécessitent un priming avant d'être libérés (Ley et al., 2018). Le priming nécessite deux étapes faisant intervenir différents facteurs : la phase aiguë (TNF- α , IL-1 β et certains *pathogen associated molecular pattern* (PAMPs) tels que le LPS) et la phase retardée (CXCL1, CXCL2 et CXCL5, LTB₄, GM-CSF). Il entraîne des modifications du cytosquelette caractérisées par le passage d'une forme ronde et facilement déformable à une forme amiboïde et plus rigide des neutrophiles (Ekpenyong et al., 2017; Vogt et al., 2018). Seuls les neutrophiles « primés » peuvent atteindre leur potentiel maximal de dégranulation et de libération de ROS. Afin de protéger l'organisme des dommages tissulaires, les neutrophiles primés peuvent retourner à leur état basal au cours d'un processus appelé le « de-priming ». Le mécanisme par lequel les neutrophiles passent d'un état activé à un état basal n'est pas encore complètement élucidé. Cependant, Chilvers et collègues ont trouvé que les neutrophiles primés, plus rigides, subissent d'importantes contraintes mécaniques en traversant le lit capillaire pulmonaire, et ces contraintes entraînent un de-priming progressif des cellules au fur et à mesure de leur progression à travers le poumon pour en sortir complètement « de-primées » et similaires à des neutrophiles à l'état basal (Ekpenyong et al., 2017; Summers et al., 2010).

Rôle des neutrophiles dans les infections virales : exemple du virus influenza

Les neutrophiles sont de puissants acteurs de la réponse anti-bactérienne (Brinkmann et al., 2004; Pedrosa et al., 2000; Witter et al., 2016) et anti-fongique (Feldmesser, 2006; Rodriguez et al., 2007). Cependant, leur rôle lors d'infections virales est beaucoup moins clair. Etant donné l'importante diversité des virus, de leur mode d'action et des réponses induites chez l'hôte, nous nous focaliserons

sur le rôle des neutrophiles lors d'infections au virus influenza, modèle qui sera utilisé au cours de cette étude. Les neutrophiles, lors d'infections par le virus de la grippe, peuvent participer à l'élimination du virus et avoir une action protectrice pour l'hôte ou, au contraire, contribuer à une aggravation de l'infection et mener à des complications si leur recrutement est excessif. En effet, plusieurs études ont montré, chez la souris, qu'une déplétion spécifique des neutrophiles au cours d'une infection au virus influenza menait à une augmentation de la mortalité, de la perte de poids ou de la charge virale (Tate et al., 2008, 2011; Tumpey et al., 1996). D'autre part, un recrutement excessif de neutrophiles au niveau du poumon de souris infectées peut amener au développement d'un syndrome de détresse respiratoire aigu (Narasaraju et al., 2011). Les neutrophiles sont les premières cellules immunitaires innées recrutées au niveau du poumon suite à une inoculation par le virus influenza. Leur recrutement au niveau du poumon débute dès le deuxième jour suivant l'inoculation virale, atteint un pic entre le cinquième et le septième jour pour ensuite diminuer progressivement jusqu'au dixième jour (Hufford et al., 2012). Les neutrophiles précèdent donc les CD⁺ inflammatoires dérivées de monocytes ainsi que les lymphocytes T qui atteignent leur pic de recrutement du dixième au douzième jour suivant l'infection virale (Hufford et al., 2012). Les neutrophiles peuvent contribuer à l'élimination du virus influenza via différents mécanismes. Tout d'abord, il a été démontré que les neutrophiles peuvent phagocyter les cellules infectées par le virus, et ce via un mécanisme dépendant du TLR4 (Hashimoto et al., 2007). Ensuite, les neutrophiles peuvent sécréter différents médiateurs associés à une diminution de la charge virale tels que la MMP-9 (Bradley et al., 2012), des cytokines pro-inflammatoires (IFN- α , IFN- γ , TNF- α , MIP-2, MIP-1 α) (Tumpey et al., 1996) et la cathelicidine LL-37 (Tripathi et al., 2013). Néanmoins, la libération de NETs ne semble pas limiter la multiplication virale lors d'une infection au virus influenza. En effet, Hemmers et collaborateurs n'observent aucune différence au niveau des symptômes ou de la charge virale des souris déficientes pour l'enzyme PAD4, impliquée dans la libération de NETs, en comparaison à des souris sauvages infectées par le virus influenza (Hemmers et al., 2011). Il est à noter cependant que la formation de NET peut également se faire via des voies indépendantes de PAD4 (Guiducci et al., 2018), ce qui laisse la possibilité que ceux-ci puissent jouer un rôle lors de l'infection. Enfin, les neutrophiles peuvent influencer la réponse immune adaptative et ainsi améliorer la destruction des cellules infectées et la neutralisation de l'infection. Dans le cadre d'une infection au virus influenza, les neutrophiles montrent d'importantes capacités d'induction de lymphocytes T CD8 spécifiques du virus. Tout d'abord, les neutrophiles peuvent agir comme cellules présentatrices d'antigènes pour les lymphocytes T CD8⁺ naïfs et en particulier induire leur sécrétion d'IFN- γ (Hufford et al., 2012). En plus de l'induction de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de l'antigène, les neutrophiles jouent un rôle important dans le recrutement de ces lymphocytes au niveau des voies aériennes lors de l'infection virale. L'attraction des lymphocytes T CD8⁺ à proximité de l'épithélium respiratoire repose sur la formation d'uropodes enrichis en CXCL12 par les neutrophiles au cours de leur migration à travers les voies aériennes vers le site d'infection (Lim et al., 2015).

1.3.4.2 Rôle dans les processus non infectieux

Réparation tissulaire

Mises à part leurs fonctions dans la destruction des pathogènes, les neutrophiles sont reconnus comme des acteurs de la réparation tissulaire. En effet, les souris déficientes pour le récepteur CXCR2, chez lesquelles le recrutement tissulaire de neutrophiles est entravé, montrent un retard de la réparation tissulaire lors de blessures cutanées, dont l'épithélialisation et la néovascularisation, en comparaison à des souris contrôles sauvages (Devalaraja et al., 2000). De plus, le vieillissement est connu pour être associé à une réparation tissulaire moins efficace. Nishio et collègues ont démontré que ce retard de réparation tissulaire lié à l'âge était dépendant d'une diminution des neutrophiles ainsi que de l'altération de leurs fonctions. L'absence de neutrophiles, obtenue à l'aide de l'anticorps déplétant anti-GR1, accentue encore considérablement le retard chez des souris âgées (20 mois) mais semble moins affecter les souris plus jeunes (2 mois) (Nishio et al., 2008).

D'un point de vue moléculaire, les neutrophiles peuvent directement promouvoir la réparation tissulaire via la synthèse du VEGF-A (Taichman et al., 1997). De manière intéressante, il a été montré qu'une population particulière de neutrophiles surexprimant le récepteur au VEGF (VEGFR1), CXCR4 et l'intégrine CD49d était recrutée au niveau de tissus ischémiques (lors de transplantation d'îlots pancréatiques avascularisés) où ils favorisaient l'angiogenèse (Massena et al., 2015). Une autre étude utilisant le même modèle a montré que l'activité pro-angiogénique de ces neutrophiles particuliers reposait sur la libération de MMP-9, sécrétée à des taux dix fois plus abondants par les neutrophiles recrutés par le VEGF-A que par les neutrophiles recrutés par un stimulus pro-inflammatoire classique, tel que *macrophage inflammatory protein* (MIP)-2 (Christoffersson et al., 2012). Les neutrophiles favoriseraient également l'angiogenèse au niveau de plaies cutanées via la libération de la pyruvate kinase M2 (Zhang et al., 2016). Enfin, lors de lésions thermiques au niveau du foie, les neutrophiles migrent rapidement au niveau de la lésion, éliminent les débris cellulaires et les vaisseaux collapsés, permettant la formation de canaux pour la revascularisation de la lésion. Dans ce modèle, la déplétion des neutrophiles via l'injection d'un anticorps déplétant anti-Ly-6G, clone 1A8, mais pas celle des macrophages, entraîne un retard de réparation tissulaire associée à une diminution du dépôt de collagène et de la revascularisation (Wang et al., 2017).

Les neutrophiles peuvent influencer indirectement la réparation tissulaire et la résolution de l'inflammation en agissant sur la polarisation des macrophages et sur les cellules épithéliales. Tout d'abord, ils favorisent l'élimination et l'évacuation des agents pathogènes via deux mécanismes distincts. Leur synthèse d'adénosine phosphatase, une fois convertie en adénosine, induit la sécrétion de chlorure par les cellules épithéliales et favorise la destruction des pathogènes au niveau du tube digestif (Aherne et al., 2015; Colgan et al., 2006). De plus, la transmigration des neutrophiles au niveau

des cellules épithéliales intestinales entraîne une surexpression des gènes codant pour la mucine et des peptides antibactériens par ces dernières ce qui favorise l'élimination de l'agent pathogène (Campbell et al., 2014). Ensuite, ils participent à la résolution de l'inflammation via la libération de vésicules extracellulaires qui ont pour effet d'inhiber la voie dépendant de NF- κ B et favorisent la synthèse de TGF- β et des résolvines D1,D2 et E2 (Bui et al., 2018; Dalli and Serhan, 2012). Aussi, leur liaison aux cellules épithéliales via ICAM-1 favorise la prolifération épithéliale via la voie Akt et β -caténine et permet une meilleure réparation tissulaire *in vivo* (Sumagin et al., 2016). Enfin, la phagocytose de neutrophiles apoptotiques par les macrophages entraîne une augmentation de leur synthèse de TGF- β et d'IL-10 (Elliott et al., 2017).

Réaction anaphylactique et choc septique

La réaction anaphylactique est une réaction allergique aiguë caractérisée par une vasodilatation importante, une bronchoconstriction, une chute de la pression cardiaque et une hypothermie (Galli and Tsai, 2012). Cette réaction repose sur la présence d'immunoglobulines, IgE et IgG, spécifiques d'un allergène. L'interaction de ces immunoglobulines, situées à la surface de cellules immunitaires comme les mastocytes, avec un allergène entraîne la dégranulation des mastocytes et la libération de différents acteurs pro-inflammatoires responsables du choc anaphylactique (Reber et al., 2017a). Dans un modèle de réaction anaphylactique active, c'est-à-dire due à une immunisation active à l'encontre d'un antigène, Jonsson et collègues ont démontré un rôle jusque là ignoré des neutrophiles. En effet, dans ce modèle, les souris déplétées en neutrophiles ne montraient pas de chute de la température et un haut taux de survie en comparaison aux souris contrôles (Jönsson et al., 2011).

Le choc septique, quant à lui, résulte d'une inflammation systémique provoquée par un agent pathogène ou des dérivés microbiens comme le LPS (on parle alors de choc endotoxique). Il entraîne une série d'événements intravasculaires qui peuvent aboutir à une défaillance cardiaque (Annane et al., 2005). Dans un modèle murin de choc septique induit par l'injection systémique de fortes doses de LPS, il a été montré récemment que la déplétion des neutrophiles aggravait la pathologie et augmentait la mortalité. Le mécanisme par lequel les neutrophiles protègent l'organisme lors de choc septique n'a pas été entièrement élucidé mais semble reposer sur l'activité de la MPO (Reber et al., 2017b).

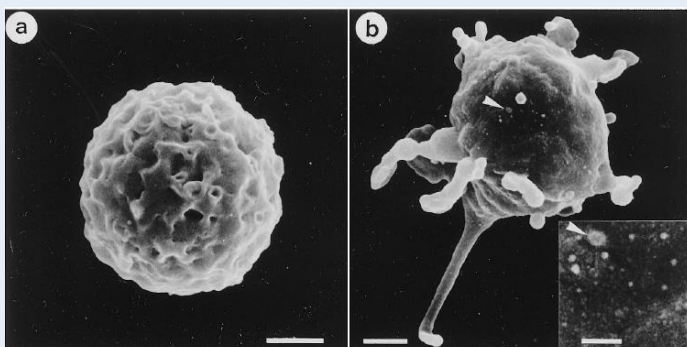
1.3.4.3 Rôle dans la régulation des systèmes immunitaires inné et adaptatif

Système immunitaire inné

Les neutrophiles peuvent moduler l'activité de différentes cellules du système immunitaire inné telles que les CD δ s, les macrophages et les cellules NK. Par exemple, il a été montré chez la souris que les neutrophiles pouvaient réguler positivement la maturation des CD δ s spléniques ou dérivées de moelle osseuse et leur synthèse d'IL-12 et de TNF- α (Bennouna et al., 2003). Chez l'homme, les neutrophiles

peuvent activer des CDs dérivées de monocytes et ce via un mécanisme contact-dépendant impliquant CD18/CEACAM-1 sur le neutrophile et DC-SIGN sur la CD. Et ainsi induire la prolifération et la différenciation de lymphocytes T naïfs en lymphocytes Th1 (Gisbergen et al., 2005a, 2005a; Megiovanni et al., 2006). Par ailleurs, chez l'homme, la libération d'ectosomes par les neutrophiles (BOX 6) peut entraîner une diminution de la maturation des cellules dendritiques dérivées de monocytes, leur conférant un phénotype tolérogénique caractérisé par une diminution des capacités de phagocytose et d'induction de la prolifération des lymphocytes T en réponse au LPS (Eken et al., 2008; Gasser and Schifferli, 2004). D'autres facteurs libérés par les neutrophiles, tels que la NE (Maffia et al., 2007) ou la MPO (Odobasic et al., 2013) peuvent également diminuer l'activation des moCDs chez l'homme (Maffia et al., 2007; Odobasic et al., 2013). Les neutrophiles peuvent aussi induire un phénotype immunorégulateur au niveau des macrophages, caractérisé par la synthèse de TGF- β ou de TGF- β et d'IL-10, suite à la libération d'ectosomes (Eken et al., 2008) ou à la phagocytose de neutrophiles, aussi connue sous le nom d'efférocytose (Elliott et al., 2017). La survie, la prolifération, l'activité cytolytique et la production d'IFN- γ des cellules NK peuvent quant à elles être modulées par les granules, les ROS et les ectosomes libérés par les neutrophiles chez l'homme (Costantini and Cassatella, 2011; Pliyev et al., 2014). Enfin, chez la souris, les neutrophiles jouent également un rôle décisif dans le développement des cellules NK (Jaeger et al., 2012).

BOX 5. Les ectosomes sont des microvésicules libérées par les neutrophiles générées à partir de la membrane plasmique de neutrophiles intacts (contrairement aux exosomes, générés à partir de l'endosome) (Sadallah et al., 2011). La composition protéique des ectosomes varie fortement en fonction de l'état d'activation du neutrophile au moment de son émission ainsi que du stimulus ayant provoqué sa libération (Nauseef and Borregaard, 2014). Les ectosomes peuvent modifier l'environnement dans lequel ils sont libérés via leur activité anti-inflammatoire, leur influence sur d'autres phagocytes et d'autres cellules immunitaires (Eken et al., 2008; Turbica et al., 2015). Ils possèdent également des



propriétés anti-microbiennes intrinsèques (Nauseef and Borregaard, 2014).

a) Neutrophile non stimulé ; b) Neutrophile stimulé au fMLP, libération d'ectosomes (flèche)

D'après (Hess et al., 1999)

Système immunitaire adaptatif

Les neutrophiles influencent également directement les acteurs de la réponse immune adaptative, à savoir les lymphocytes B, T CD4⁺ et T CD8⁺. En effet, la survie et la prolifération des lymphocytes B peuvent être influencées par le *B cell activating factor* (BAFF) ou le *A proliferation inducing ligand* (APRIL) libérés par les neutrophiles suite à une stimulation par un agent pathogène (Deniset et al., 2017; Scapini et al., 2008) chez l'homme et la souris. Leur action sur les lymphocytes T CD4⁺ peut être immunosuppressive via la synthèse de ROS et d'arginase 1 et entraîner une inhibition de la prolifération et de l'activation des lymphocytes T naïfs (Boari et al., 2012; Pillay et al., 2012). Les neutrophiles peuvent aussi se comporter comme des cellules présentatrices d'antigène dans certaines conditions, comme par exemple, suite à une stimulation par l'IFN- γ (Takashima and Yao, 2015). Ils sont capables d'augmenter leur expression du MHC-II et de molécules co-stimulatrices et de migrer vers le ganglion lymphatique drainant où ils sont capables d'induire la différenciation de lymphocytes T naïfs en lymphocytes Th1 ou Th17 ou de transférer l'antigène à des CD⁺ ganglionnaires (Abi Abdallah et al., 2011; Beauvillain et al., 2007, 2011). Enfin, les neutrophiles peuvent engager l'activation et la prolifération de lymphocytes T CD8⁺ au niveau de la moelle osseuse (Duffy et al., 2012).

1.3.5 Hétérogénéité des neutrophiles

Cette dernière décennie, de nombreuses études ont identifié différents phénotypes au niveau des neutrophiles, associés à des fonctions diverses. Dans un modèle d'infection modérée à *Staphylococcus aureus*, trois populations distinctes de neutrophiles ont été identifiées chez la souris, chacune présentant un répertoire de cytokines et chimiokines, des fonctions et une morphologie propres (Tsuda et al., 2004). Une infection à *Trypanosoma cruzi* ou d'autres pathogènes induisent le recrutement de neutrophiles particuliers, exhibant des fonctions anti-inflammatoires (Boari et al., 2012; Zhang et al., 2009). Par ailleurs, diverses conditions inflammatoires, telles que le cancer ou certaines maladies auto-immunes, sont associées à la présence de neutrophiles de faible densité (*low density neutrophils*, LDNs) (Deniset and Kubes, 2018). Ces LDNs comprennent aussi bien des neutrophiles immatures que matures, en proportions variables selon le stimulus inflammatoire (Scapini et al., 2016), et présentent des fonctions anti-inflammatoires dans le cas du cancer (Moses and Brandau, 2016) ou pro-inflammatoires dans le cadre du lupus érythémateux ou du psoriasis (Carmona-Rivera and Kaplan, 2013). Ces différentes études témoignent d'une complexité, ignorée jusqu'alors, des neutrophiles. Cependant, l'appartenance de ces neutrophiles à des sous-populations bien distinctes impliquerait l'existence de programmes de différenciation bien définis et basés sur la contribution de facteurs de transcription spécifiques lors du développement, comme c'est le cas, par exemple, pour les monocytes, macrophages ou CD⁺ (De Kleer et al., 2014). Jusqu'à présent, de tels programmes de différenciation n'ont pas encore pu être identifiés pour les neutrophiles. Dès lors, la division des neutrophiles en sous-populations semble risquée et ces différents phénotypes résulteraient plutôt de la grande capacité d'adaptation et de l'importante plasticité

des neutrophiles en réponse à leur environnement. La table 2 résume les principales « sous-populations » identifiées jusqu'à présent.

Table 2. Hétérogénéité des neutrophiles

<i>Sous-population</i>	<i>Phenotype</i>	<i>Localisation</i>	<i>Fonctions</i>	<i>Espèces</i>	<i>Ref</i>
<i>'Aged' neutrophiles</i>	CXCR4 ^{high} CD62L ^{dim} Noyau hypersegmenté	Sang (libération suivant le rythme circadien)	Augmentation ROS, IL-1β, IL-1α, IL-6, TNF-α, IFN-γ, IL-10 Augmentation libération NETs	SOURIS HUMAIN	(Adrover et al., 2016; Uhl et al., 2016) (Zhang et al., 2015)
	CD49d ⁺	Recrutés dans le poumon suite à une infection au virus Sendai Augmentés dans les poumons de patients asthmatiques	Induit l'expression de récepteurs aux IgE sur les cellules dendritiques ?	SOURIS HUMAIN	(Cheung et al., 2010) (Sigua et al., 2014)
<i>Tumor associated Neutrophils (N2)</i>	Mélange de neutrophiles au noyau en anneau (65%) et hypersegmentés (35%)	Associés aux tumeurs	Pas d'effet sur le développement de la tumeur Inhibition de la prolifération des T CD8+ in vitro migration et production de ROS diminués in vitro	SOURIS	(Sagiv et al., 2015)
	FSC ^{high} CD11b ^{dim}	Associés aux tumeurs		HUMAIN	
<i>Tumour Associated Neutrophils (N1)</i>	Hypersegmentés FSC ^{low}	Associés aux tumeurs	Diminuent le développement de la tumeur suite à une haute activité cytotoxique in vitro	SOURIS	(Sagiv et al., 2015)
		Associés aux tumeurs		HUMAIN	
<i>CD177⁺</i>	CD177 ⁺	Sang	Activité bactericide, ROS, MPO et libération de NETs augmentée	SOURIS	(Hu et al., 2009; Ramirez-Velazquez et al., 2014; Zhou et al., 2017)
		Augmentés chez les patients asthmatiques neutrophiliques et ANCAs (antineutrophil cytoplasmic autoantibodies-associated vasculitis)	?	HUMAIN	

<i>Angiogeniques</i>	CD49d ⁺ VEGFR1 ^{high} CXCR4 ^{high}	Tissus ischémiques	Stimulation de l'angiogenèse dans un modèle de transplantation d'îlots pancréatiques	SOURIS	(Massena et al., 2015)
		?	Propriétés pro-angiogéniques via la libération de MMP-9 in vitro	HUMAIN	(Christoffersson et al., 2012)
<i>Olfactomedin-4⁺</i>	Olfactomedin-4 ⁺	?	Régulateur négatif de la destruction des bactéries	SOURIS	(Amirbeagi Firoozeh et al., 2014; Clemmensen Stine N. et al., 2011; Liu et al., 2012)
		Associés aux vasculitis ANCA	?	HUMAIN	

BOX 6. Outils pour l'étude des neutrophiles in vivo.

Déplétion des neutrophiles

Anticorps déplétants : Deux anticorps déplétants peuvent être utilisés pour l'étude du rôle des neutrophiles : l'anti-Gr1 et l'anti-Ly-6G. L'anti-Gr1, initialement reconnu pour être spécifique des neutrophiles, permet une déplétion de ces derniers durant 3 à 5 jours en fonction de la dose administrée (Jensen et al., 1993). Cependant, des études plus récentes ont démontré que Gr1 est en réalité composé de deux sous-unités, Ly-6G, spécifiquement exprimé par les neutrophiles et Ly-6C, exprimé par les monocytes et les cellules dendritiques (Fleming et al., 1993). L'utilisation de ce dernier ne constitue donc pas une méthode de choix au vu de son manque de spécificité. L'anti-Ly-6G est quant à lui spécifique des neutrophiles (Daley et al., 2008). Plusieurs clones différents existent. Le clone 1A8 montre une très bonne spécificité mais une efficacité limitée. En effet, son utilisation permet d'obtenir une déplétion des neutrophiles sanguins, de la rate et du foie mais uniquement durant 2 jours (Daley et al., 2008). Le clone NIMP-R14 induit une déplétion plus efficace et plus longue du nombre de neutrophiles mais semble beaucoup moins spécifique que le clone 1A8 et induit également une diminution des monocytes (Charmoy et al., 2016; Ribeiro-Gomes et al., 2007).

Inhibition du trafficking : Lors de l'étude du rôle des neutrophiles au niveau de certains organes cibles, l'inhibition de l'entrée des neutrophiles au niveau de ces organes semble être un bon compromis. En effet, cette méthode permet d'éviter l'apparition d'un effet rebond, puisque les neutrophiles de la moelle osseuse et du sang ne sont pas touchés (Reutershan et al., 2006). La molécule la plus fréquemment utilisée est l'antagoniste du CXCR2 (Watz et al., 2017). En fonction de l'organe étudié,

son efficacité peut-être plus ou moins élevée. Néanmoins, CXCR2 est également exprimé par les monocytes et les cellules endothéliales et peut donc manquer de spécificité (Reutershan et al., 2006; Traves et al., 2004).

Souris PMN-DTR : Les souris n'expriment pas le récepteur à la toxine diphtérique et présentent donc une résistance naturelle à cette toxine. L'introduction de l'expression de ce récepteur spécifiquement par les neutrophiles peut constituer un bon moyen de dépléter ces cellules. Ceci peut être accompli en croisant des souris ROSA-lox-STOP-lox DTR avec des souris exprimant la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur de MRP8, spécifique des neutrophiles. Les souris résultantes de ces croisements posséderont des neutrophiles exprimant le récepteur pour la toxine diphtérique qui pourront être déplétés suite à l'injection de cette toxine (Gillis and Reber, 2018).

Souris déficientes en neutrophiles : Au vu du turnover rapide et du recrutement important des neutrophiles dans des conditions inflammatoires, l'utilisation de souris neutropéniques pourraient représenter un avantage considérable par rapport à l'injection ponctuelle d'anticorps déplétants ou de toxine diphtérique. Malheureusement, à ce jour, les souris déficientes en neutrophiles sont relativement peu utilisées suite à leur faible taux de naissance ou de survie (MRP8^{Cre}-Mcl1^{fl/fl} (Csepregi et al., 2018), LysM^{Cre}-Mcl1^{fl/fl} (Csepregi et al., 2018), Gfi1^{-/-} (Karsunky et al., 2002)), ou à la déplétion d'autres cellules du système immunitaire ou d'autres effets secondaires (G-CSFR^{-/-} (Liu et al., 1996), Gfi1^{-/-} (Karsunky et al., 2002), Genista (Ordoñez-Rueda et al., 2012), LysM^{Cre} Mcl1^{-/-} (Csepregi et al., 2018)) (Stackowicz et al., 2020).

1.4 Les neutrophil extracellular traps (NETs)

1.4.1 Définition

La formation de *neutrophil extracellular traps* (NETs) a été découverte en 2004 par Arturo Zychlinsky et son équipe (Brinkmann et al., 2004). Les NETs sont des structures extracellulaires, en forme de filet, composées de filaments de chromatine décondensée, comprenant de l'ADN nucléaire ou mitochondrial (Lood et al., 2016) associé à des protéines d'histones citrullinées ainsi qu'à une large variété de protéines antimicrobiennes originaires des granules cytoplasmiques des neutrophiles (NE, MPO, calprotectine, cathelicidine, défensines) (Dwyer et al., 2014; Papayannopoulos, 2017; Urban et al., 2009). D'une part, la formation de NETs peut se produire relativement lentement (3 à 8 heures), entraînant systématiquement la mort cellulaire. D'autre part, les neutrophiles sont capables de libérer rapidement des NETs, à partir de vésicules (Pilschek et al., 2010) ou d'ADN nucléaire (Yipp et al., 2012) sans compromettre leurs capacités de phagocytose ou de migration et sans entraîner la mort cellulaire (Yipp et al., 2012). Certains auteurs parlent respectivement de NETose suicidaire ou de NETose vitale (Yipp et al., 2012). Le terme NETose faisant référence à une forme particulière de mort cellulaire et

étant sujet à débat entre les spécialistes du domaine, nous préférons parler de formation ou de libération de NETs plutôt que de NETose.

1.4.2 Formation

Une large gamme d'événements peut aboutir à la formation de NETs. Parmi ceux-ci, on trouve les bactéries (Brinkmann et al., 2004), les agents fongiques (Urban et al., 2006), les virus (Saitoh et al., 2012), les parasites (Guimarães-Costa et al., 2009), les complexes immuns immobilisés (Behnen et al., 2014) ou les cristaux (oxalate de calcium, monosodium d'urate, cystine, silica,...) (Desai et al., 2016; Schorn et al., 2012). L'interaction entre certains motifs particuliers de ces agents et leurs récepteurs respectifs (comme le TLR4, RAGE, le TLR2, dectin 2, CR3, les FCγR) entraîne une augmentation de la concentration cytoplasmique de Ca^{2+} . Cette forte concentration de Ca^{2+} active la voie Raf/MEK/ERK puis la pyruvate kinase C, qui, à son tour, induit la phosphorylation de gp91phox, aboutissant à l'assemblage des sous-unités membranaires et cytosoliques de la NADPH oxydase. Ce complexe, une fois fonctionnel, induit la formation de ROS, responsables de la rupture des granules et de l'enveloppe nucléaire. Le contenu des granules, dont la NE et la MPO, est libéré dans le cytoplasme et transloque vers le noyau afin de participer à la décondensation de la chromatine (Papayannopoulos et al., 2010). Parallèlement, l'enzyme *peptidyl-arginine deaminase 4* (PAD4) remplace, au niveau des histones, les motifs arginine, chargés positivement, par des motifs citrulline, non chargés. Cette perturbation des charges électrostatiques permet la décondensation complète de la chromatine et le clivage protéolytique des histones. Enfin, la membrane cytoplasmique se rompt pour libérer le NET dans le milieu extracellulaire (Yang et al., 2016a) (Figure 8).

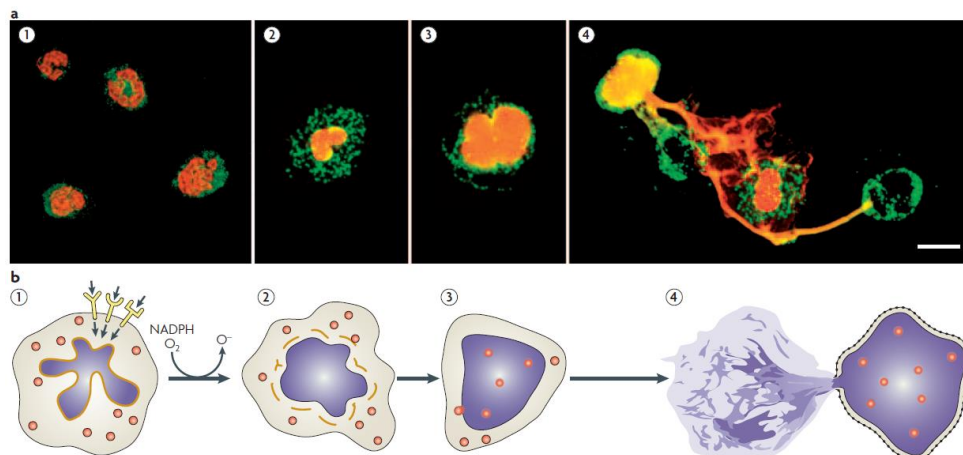


Figure 8. Formation des NETs. (a) Immunofluorescence (b) Schémas représentant les étapes de la formation des NETs. 1. Activation conduisant à la formation de ROS ; 2. Désintégration de la membrane nucléaire et perte de l'intégrité des granules ; 3. Mélange du contenu nucléaire avec les granules ; 4. Libération du NET. D'après (Brinkmann et al., 2004)

En plus des voies de signalisation menant à la formation de ROS, la voie de la *phosphatidylinositol 3 kinase* (PI3K), de l' *IL-1 receptor-associated kinase* (IRAK) (Mitroulis et al., 2011) et AKT jouent également un rôle important dans la formation des NETs (Papayannopoulos, 2017). L'implication de PI3K suggère un rôle de l'activation de l'autophagie dans la formation de NETs (Mitroulis et al., 2011; Skendros et al., 2018). En effet, l'inhibition de mTOR, un régulateur de l'autophagie, entraîne une forte augmentation de la libération de NETs (Itakura and McCarty, 2013). Enfin, les cristaux peuvent induire la formation de NETs mais sont également des inducteurs de nécroptose. De plus, Les souris déficientes pour la *receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3* (RIP3K), une enzyme impliquée dans la nécroptose, sont également incapables de former des NETs (Desai et al., 2016). Ces évidences suggèrent également un rôle de la nécroptose dans la formation de NETs.

BOX 7. Exceptions aux mécanismes de formation des NETs. Bien que la production de ROS soit une des voies les plus décrites dans la formation des NETs, certaines études rapportent la formation de NETs et ce, indépendamment de l'induction des ROS. C'est le cas, par exemple, pour les NETs « vitaux », formés rapidement (Rochael et al., 2015). De même la NE et la MPO (Martinod et al., 2016; Parker et al., 2012a) ou l'enzyme PAD4 (Hosseinzadeh et al., 2016; Warnatsch et al., 2015) peuvent dans certaines situations ne pas être indispensables pour la formation des NETs. Ces résultats en apparence conflictuels mettent surtout en lumière la complexité de la formation des NETs et la nécessité d'élargir nos connaissances à propos de ce phénomène.

1.4.3 Régulation

Les NETs contiennent de nombreuses protéases, des histones et de l'ADN, ces différents composés peuvent avoir des effets toxiques sur les tissus environnants. Les NETs peuvent induire la mort des cellules épithéliales et endothéliales (Villanueva et al., 2011), ils favorisent la formation de thrombi et sont associés à des dommages au niveau de différents organes (Papayannopoulos, 2015). Dès lors, leur formation doit être finement régulée. La taille des agents pathogènes est un des facteurs déterminants de la formation de NETs. En effet, la formation de NETs et la phagocytose nécessitent toutes deux l'utilisation de la NE pour permettre la décondensation de la chromatine et pour participer à l'élimination du pathogène en fusionnant avec le phagosome, respectivement (Branzk et al., 2014). La phagocytose, en séquestrant la NE dans le phagosome, empêche sa translocation vers le noyau et antagonise donc la formation de NETs. Le choix de l'induction de l'un ou l'autre processus reposerait principalement sur la taille de l'agent pathogène. Branzk et ses collègues ont, en effet, démontré que les agents pathogènes de petite taille induisaient préférentiellement la phagocytose, en interagissant avec le récepteur dectine 1, tandis que les agents pathogènes de taille trop importante pour être phagocytés dirigeaient le choix du neutrophile vers la libération de NETs (Branzk et al., 2014). Toutefois, les agents pathogènes de petite taille capables de s'évader du phagosome, d'interférer avec sa maturation ou sa

formation, ou possédant des facteurs de virulence comme la libération de toxines, d'adhésines ou d'invasines, cibleraient préférentiellement la voie des NETs (Papayannopoulos, 2017). Certains microorganismes peuvent inhiber la production de ROS en interagissant avec les récepteurs Siglec-5 et Siglec-9 (Ali et al., 2014), via des acides sialiques (Chang et al., 2014) ou en créant des biofilms (Johnson et al., 2016) et de ce fait empêcher la formation de NETs. Enfin, l'induction de la synthèse d'IL-10 peut également empêcher la formation de NETs (Saitoh et al., 2012) (Figure 8).

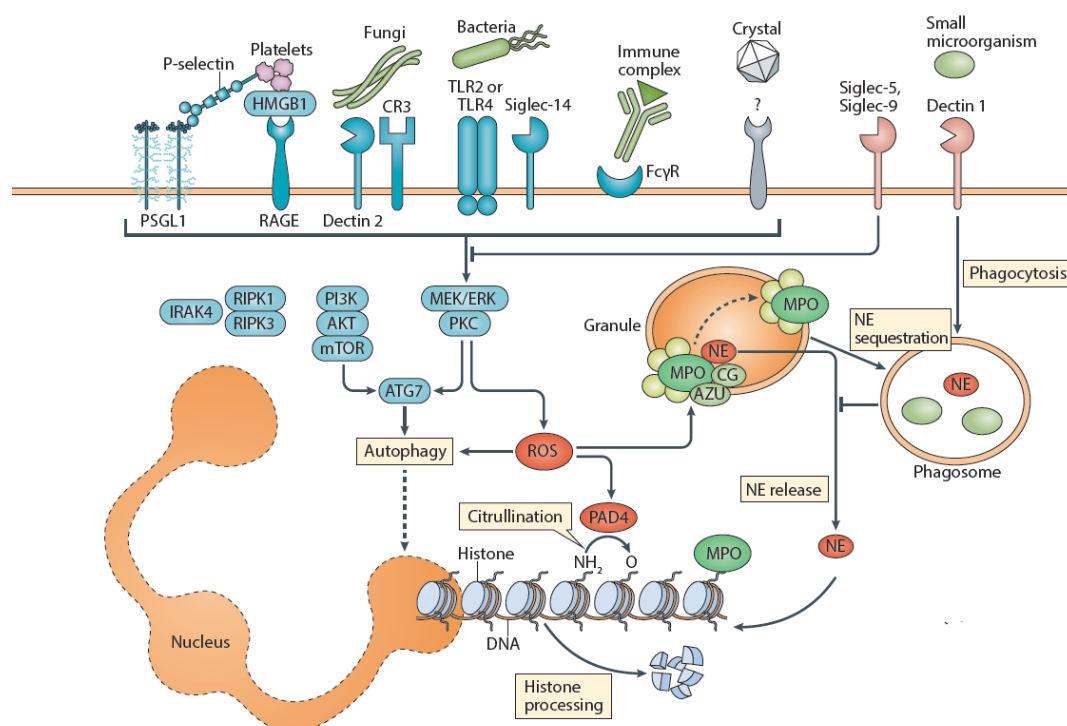


Figure 8. Formation des NETs. Différents stimuli peuvent conduire à l'induction de NETs. La formation de ROS, via la voie MEK/ERK/PKC, l'autophagie, via la régulation de PI3K, AKT et mTOR et la necroptose, via la voie IRAK4/RIPK3 sont les trois voies majeures d'induction des NETs. Les ROS conduisent à la dégradation des membranes de granules et permettent la translocation de la MPO et de NE vers le noyau. La MPO et la NE entament alors la décondensation de la chromatine. PAD4, via la citrullination des histones renforce l'action de MPO et NE. La formation des NETs peut être régulée suivant la taille des microorganismes. Les agents pathogènes de petite taille, via dectine 1, favorisent la phagocytose et la séquestration de NE dans le phagosome. L'engagement de Siglec-5 et Siglec-9 inhibe également la formation des NETs. D'après (Papayannopoulos, 2017)

1.4.4 Elimination

Lors de la résolution de l'inflammation, les NETs sont rapidement résorbés et éliminés des tissus, principalement par les macrophages (Farrera and Fadeel, 2013). La clairance des NETs par les macrophages est un processus dynamique d'endocytose-phagocytose impliquant le réarrangement des filaments d'actine (Farrera and Fadeel, 2013) et peut être facilitée par l'opsonisation des NETs par le facteur du complément C1q (Farrera and Fadeel, 2013). Enfin, la DNase I présente dans le sérum

participe, de manière déterminante, à la clairance des NETs. En effet, les pathologies ou les pathogènes diminuant l'activité de la DNase I entraînent une incapacité d'éliminer totalement les NETs et engendrent de nombreux dommages tissulaires (Hakim et al., 2010).

1.4.5 Fonctions

1.4.5.1 Rôle dans la défense de l'hôte

De nombreux agents pathogènes induisent la libération de NETs et ces derniers participent de manière effective à l'élimination de bactéries (Brinkmann et al., 2004; Pilsczek et al., 2010), de mycoses (Bianchi et al., 2011; Urban et al., 2006) et de parasites (Hermosilla et al., 2014). Leur rôle dans le cadre des infections virales n'est pas tout-à-fait déterminé. Certaines études décrivent une neutralisation des virus par les NETs chez l'homme et la souris (Jenne et al., 2013; Saitoh et al., 2012), tandis que d'autres n'observent aucun effet de l'inhibition des NETs sur l'évolution de l'infection virale (Hemmers et al., 2011), voire même une aggravation de la pathologie par les NETs (Narasaraju et al., 2011) chez la souris. Les NETs neutralisent les agents pathogènes par trois mécanismes principaux. Premièrement, ils permettent de piéger un grand nombre de pathogènes, de les concentrer, et d'éviter leur dissémination à travers tout l'organisme (Juneau et al., 2011). Ainsi, lors de sepsis induit par l'injection par voie intraveineuse de *Escherichia Coli*, la présence de NETs aux niveaux des sinusoides hépatiques permet la capture de quatre fois plus de bactéries que par les cellules de Kupffer seules (McDonald et al., 2012). Deuxièmement, les composants des NETs sont également capables de cliver les facteurs de virulence des agents pathogènes. La NE dégrade les facteurs de virulence des bactéries Gram négatives (Brinkmann et al., 2004), la cathepsine G et la protéinase 3 peuvent également cliver les facteurs de virulence de *Shigella* (Averhoff et al., 2008). Troisièmement, les constituants des NETs peuvent avoir des propriétés antimicrobiennes intrinsèques. La MPO, via la production d'acide hypochloreux, permet la destruction de *Staphylococcus aureus* (Parker et al., 2012b). La calprotectine, un chélateur d'ions bivalents, empêche la croissance de *Candida Albicans* (Urban et al., 2009). L'ADN, lui-même, est un puissant agent antimicrobien. Les liens phosphodiester de la structure de l'ADN sont des puissants chélateurs de cations. Dès lors, à haute concentration dans le milieu extracellulaire, ils entraînent des perturbations importantes de l'intégrité de la membrane des bactéries menant à leur lyse (Halverson et al., 2015).

1.4.5.2 Rôle dans la régulation des cellules immunitaires

Les NETs influencent également les acteurs cellulaires des systèmes immunitaires inné et adaptatif. Chez l'homme, les complexes ADN-peptides antimicrobiens des NETs, en particulier le LL37, activent les pCDs en interagissant avec le TLR9 (Lande et al., 2011). Cette activation provoque la synthèse d'IFN de type I qui activent les moCDs et stimulent les lymphocytes T CD4⁺ naïfs de la rate

et leur différenciation en Th1 et Th17 (Qiu et al., 2017) dans des modèles murins. D'autre part, les NETs transfèrent des auto-antigènes, comme la MPO, la PR3 et l'ADN directement aux moCDs (Sangaletti et al., 2012). Des moCDs préalablement incubées avec des NETs et transférées à des souris naïves par voie intrapéritonéale suffisent à induire une auto-immunité contre ces antigènes et au développement de vasculite « *anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies-associated* » (ANCA) (Sangaletti et al., 2012). Cependant, dans des modèles de co-culture de cellules sanguines humaines, les moCDs stimulées au LPS en présence de NETs, montrent une diminution de la synthèse de TNF- α , d'IL-6, d'IL-12 et d'IL-23 ainsi qu'une moindre capacité à induire la prolifération et l'activation des lymphocytes T naïfs sans altérer leur expression de CCR7 et CXCR4, indispensables à leur migration au niveau du ganglion lymphatique. Les moCDs co-cultivées avec les NETs modulent la polarisation des lymphocytes T naïfs, en favorisant le développement de lymphocytes Th2 et la synthèse d'IL-5 et d'IL-13 (Barrientos et al., 2014). Dans des modèles murins d'artériosclérose, les NETs, formés suite au contact des neutrophiles avec les cristaux de cholestérol, stimulent la production d'IL-1 β par les macrophages. L'IL-1 β favorise la sécrétion d'IL-17 par les lymphocytes Th17, qui, à leur tour, amplifient la boucle inflammatoire (Warnatsch et al., 2015). Enfin, les NETs libérés par des neutrophiles humains peuvent interagir *in vitro* directement avec les lymphocytes T naïfs via un contact direct impliquant le TCR mais pas le TLR9 (Tillack et al., 2012). Ce contact diminue le seuil d'activation des lymphocytes et augmente leur expression de CD25 et CD69, accroissant leur synthèse d'IFN- γ et d'IL-17A face à un antigène (Tillack et al., 2012).

1.4.5.3 Rôle dans les processus non-infectieux

Les NETs possèdent d'importantes propriétés antimicrobiennes et stimulatrices des systèmes immunitaires inné et adaptatif. A côté de ces effets bénéfiques pour l'organisme, une production excessive ou un défaut de dégradation des NETs ont été impliqués dans de nombreuses maladies auto-immunes. Comme décrit précédemment, les NETs sont une source importante d'auto-antigènes et ont été identifiés chez l'homme et la souris dans des maladies telles que la vasculite ANCA (Söderberg and Segelmark, 2016), le lupus érythémateux (Hakkim et al., 2010) et l'arthrite rhumatoïde (Wright et al., 2014). Chez la souris, ils fournissent un support et activent l'adhésion des plaquettes pour former des thrombi (Fuchs et al., 2010). Leur action stimulatrice sur les macrophages favorise le développement de l'artériosclérose (Warnatsch et al., 2015) et est également impliquée dans la pathogénie du syndrome d'ischémie-reperfusion (Jansen et al., 2017) chez la souris. Au niveau du poumon, lors de fibrose cystique, les modifications tissulaires favorisent la formation de NETs, l'augmentation de l'ADN extracellulaire densifie le mucus qui finit par former des biofilms favorables à la colonisation par certains agents pathogènes (Hahn et al., 2013) chez l'homme et la souris. On en retrouve dans le sputum des patients asthmatiques souffrant d'asthme neutrophilique et de COPD (Liu et al., 2017b). Ils favorisent également la formation de métastases dans des modèles murins (Rocks et al., 2019).

Ces différentes fonctions témoignent des rôles complexes que peuvent jouer les NETs, tant dans des processus bénéfiques pour l'organisme que dans diverses pathologies, résultat de leurs effets délétères lorsque leur régulation est entravée.

BOX 8 Outils pour l'étude des NETs in vivo.

Inhibiteurs de la libération des NETs : Deux inhibiteurs sont principalement utilisés pour empêcher la libération des NETs dans le milieu extracellulaire : les inhibiteurs de PAD4 et les inhibiteurs de la neutrophile élastase. Les principaux inconvénients de ces inhibiteurs résident dans le fait que la voie de libération de NETs dépend fortement du stimulus et n'implique pas systématiquement PAD4 et/ou la neutrophile élastase (Martinod et al., 2016; Warnatsch et al., 2015). De plus, ces deux enzymes jouent également des rôles importants dans des processus indépendants des NETs (Jones et al., 2009; Maffia et al., 2007; Voynow et al., 2004). L'antagoniste de CXCR2 a également été démontré pour altérer la libération des NETs (Watz et al., 2017). Cependant, ce dernier montre de nombreux autres effets non seulement au niveau des neutrophiles mais également des monocytes et des cellules endothéliales (Reutershan et al., 2006; Traves et al., 2004).

Agent dégradant les NETs : La DNase dégrade de manière efficace les NETs. Ses effets sont également relativement spécifiques (Ge et al., 2014). L'inconvénient principal est qu'elle permet uniquement de cliver les NETs et n'inhibe aucunement les protéases associées à ces derniers.

Souris déficientes en neutrophiles : Deux souches de souris déficientes en NETs existent actuellement : MRP8^{Cre}-PAD4^{fl/fl} et les NE^{-/-} (Papayannopoulos et al., 2010), ce souris présentent les mêmes inconvénients que les inhibiteurs de ces deux enzymes mais permettent d'éviter des injections répétées d'inhibiteurs. De plus, la souris MRP8^{Cre}-PAD4^{fl/fl} présente une spécificité plus importante due à la délétion de PAD4 limitée uniquement aux neutrophiles.

1.5 Les rôles des neutrophiles dans l'asthme allergique

Cette section est basée sur une publication d'un article de revue dans *Current Opinion in Immunology* en 2018 (Radermecker et al., 2018).

1.5.1 Recrutement des neutrophiles dans les voies aériennes lors d'asthme allergique

Bien que les neutrophiles ne soient pas systématiquement présents dans les voies aériennes des patients asthmatiques, ils font partie des premières cellules immunitaires recrutées dans le poumon durant certains phénomènes liés à l'asthme tels que les réexpositions allergéniques (Lavinskiene et al., 2014; Lommatzsch et al., 2006; Silvestri et al., 1997), les exacerbations induites par des infections

virales respiratoires (John V. Fahya et al., 1995; Norzila et al., 2000; Toussaint et al., 2017) ou encore les crises d'asthme nocturnes (Martin et al., 1991). Chez la souris, une exposition aérienne à des allergènes pertinents permettant d'induire les caractéristiques de l'asthme allergique est aussi associée à un recrutement de neutrophiles dans les voies aériennes (Hosoki et al., 2015, 2016; Post et al., 2012; Toussaint et al., 2017).

Comme dans les autres tissus, le recrutement des neutrophiles dans les voies respiratoires comprend plusieurs étapes initiées par l'expression, par les cellules endothéliales, de molécules d'adhésion (Kolaczowska and Kubes, 2013) et suivie par l'extravasation et la migration suivant un gradient de chimiokines. Dans un modèle murin de réexposition à l'aide d'extraits de pollen d'ambrosie, Hosoki et collègues ont démontré que le recrutement pulmonaire de neutrophiles était significativement diminué chez des souris déficientes pour le récepteur au LPS, le TLR4 (Hosoki et al., 2015). De même, l'inhibition du CXCR2 réprime le recrutement inné de neutrophiles suite à une réexposition allergénique (Hosoki et al., 2015), et la production des chimiokines CXCL1, CXCL2 et CXCL5 dépend de l'expression du TLR4 et de son co-récepteur MD2 en réponse aux poils de chats et autres pollens (Hosoki et al., 2015, 2016). Ces chimiokines pourraient être produites par les cellules épithéliales. En effet, ces dernières produisent de l'IL-8 (l'homologue humain de CXCL1, CXCL2 et CXCL5) suite à une exposition à un allergène (Hosoki et al., 2016; Röschmann K I. L. et al., 2011). De plus, les macrophages alvéolaires peuvent aussi libérer du CXCL1 et CXCL2 en réponse à l'activation des récepteurs FcγIII induite par des allergènes ou des anticorps (Taube et al., 2003). Chez l'humain, les niveaux de CXCL8 dans le sputum sont augmentés durant les phases d'exacerbations aiguës de l'asthme allergique (Norzila et al., 2000) et suivant une réexposition allergénique (Lavinskiene et al., 2014) et sont associés avec une augmentation du chimiotactisme des neutrophiles du sputum et du sang (Lavinskiene et al., 2014).

Oyoshi et collègues ont démontré, dans un modèle d'allergie cutanée, que la synthèse intrinsèque par les neutrophiles de leucotriène B4 (LTB4) et son récepteur, BLT1, sont impliqués dans le recrutement des neutrophiles (Oyoshi et al., 2012). De manière intéressante, les taux de LTB4 sont augmentés dans le lavage bronchoalvéolaire des patients asthmatiques souffrant d'asthme nocturne (Wenzel et al., 1995) ainsi que dans le condensat d'air expiré des enfants (Csoma et al., 2002) et adultes asthmatiques (Biernacki et al., 2003). Enfin, l'utilisation d'inhibiteurs du LTB4 chez les patients asthmatiques conduit à une diminution importante des neutrophiles du lavage bronchoalvéolaire (Evans et al., 1996).

L'IL-4, cytokine associée à une réponse immunitaire de type 2, peut contrôler le recrutement des neutrophiles dans le contexte de l'asthme allergique. En effet, une étude récente a montré que l'IL-4 pouvait empêcher l'expansion des neutrophiles et leur migration en interagissant avec le récepteur de l'IL-4 situé au niveau des neutrophiles (Woytschak et al., 2016). Le traitement *ex vivo* des neutrophiles

dérivés de moelle osseuse avec l'IL-4 inhibe la migration de ces neutrophiles en réponse aux CXCL1 et CXCL2 par des mécanismes dépendant du récepteur de l'IL-4 (Woytschak et al., 2016). Dans un modèle de poche d'air cutanée, le recrutement de neutrophiles par la voie dépendant de CXCR2 est également inhibé lorsque la demi-vie biologique de l'IL-4 est prolongée (Woytschak et al., 2016). La contribution de l'axe IL-4-récepteur/IL-4 dans la régulation du nombre de neutrophiles dans les voies aériennes de patients asthmatiques ou lors d'expérimentations animales requiert de plus amples investigations. Les mastocytes, dont la dégranulation médiée par les allergènes et les IgE contribue à la phase aiguë de la réaction allergique, peuvent également réguler de manière négative l'afflux de neutrophiles dans les voies respiratoires des asthmatiques. De fait, les niveaux de tryptases spécifiques des mastocytes sont élevés dans le lavage bronchoalvéolaire des patients asthmatiques (Bettiol J. et al., 2001), et ces mêmes tryptases ont montré un effet chimio-répulsif important pour les neutrophiles *in vitro* (White et al., 2018)

1.5.2 Caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des neutrophiles dans l'asthme allergique

Plusieurs évidences suggèrent que les neutrophiles subissent de profonds changements dans le sang et les poumons des individus souffrant d'asthme allergique. Une étude clinique récente a comparé les réponses immunitaires innées de deux populations d'enfants (Amish et Hutterite) partageant les mêmes origines, les mêmes styles de vie mais exposés à différents taux d'endotoxines (LPS) (Stein et al., 2016). Les Hutterite, élevés dans un environnement pauvre en endotoxines sont susceptibles à développer de l'asthme allergique tandis que les Amish, vivant dans un environnement riche en endotoxines, sont protégés contre l'asthme allergique (Stein et al., 2016). En particulier, les neutrophiles sanguins des Hutterite, susceptibles à l'asthme allergique, expriment des hauts niveaux de CXCR4 et de CD11b à leur surface, ainsi que des taux de CD11c diminués, en comparaison aux neutrophiles des Amish (Stein et al., 2016). Les neutrophiles sanguins et des voies nasales de patients asthmatiques expriment également des niveaux supérieurs de CD49d à leur surface par rapport à des sujets sains (Sigua et al., 2014). L'expression de CD49d est encore augmentée six heures après une réexposition à un allergène (Sigua et al., 2014), évoquant une interaction directe entre le neutrophile et l'allergène. Une telle interaction peut être obtenue par la liaison de l'allergène aux récepteurs à haute affinité aux IgE dont l'expression est supérieure sur les neutrophiles sanguins de patients asthmatiques (Gounni et al., 2001) et augmentée durant la saison des pollens (Alphonse et al., 2008). Cette interaction spécifique entre l'allergène et le récepteur de haute affinité aux IgE FcεR1 à la surface du neutrophile accroît les réponses fonctionnelles en augmentant la sécrétion de produits dérivés du neutrophiles chez les patients asthmatiques, comme la MMP-9 (Ventura et al., 2014), la NE (Monteseirín et al., 2003), la MPO (Monteseirín et al., 2001), l'IL-8 (Monteseirín et al., 2004), la protéine cationique éosinophilique (Venge et al., 1999) et les ROS (Monteseirín et al., 1996). En outre, en comparaison aux neutrophiles de patients sains, les neutrophiles de patients asthmatiques exhibent une réponse fonctionnelle renforcée *in vitro*, entre autres, une augmentation des capacités migratoires, une meilleure phase de digestion dans des tests

de phagocytose (Mosca et al., 2015) et une hausse de la sécrétion de TNF- α , GM-CSF ou IFN- γ (Hartl et al., 2008).

Récemment, Toussaint et collègues ont montré dans un modèle d'exacerbations de l'asthme allergique par le rhinovirus chez l'homme, que le rhinovirus favorisait la libération d'ADN double brin de l'hôte et de NE, deux composants majeurs des NETs (Toussaint et al., 2017), supportant l'idée que des neutrophiles prêts à libérer des NETs sont recrutés durant les phases d'exacerbations de l'asthme allergique induites par le rhinovirus.

1.5.3 Contribution des neutrophiles à la pathogénie de l'asthme allergique

Etant donné leur présence, leur phénotype spécifique et leur capacité à libérer une série de produits au cours de l'asthme allergique, les neutrophiles sont des candidats intéressants pour contribuer à sa pathogénie (Figure 10).

Dans un modèle d'allergie respiratoire, Hosoki et collègues ont démontré que l'inhibition du recrutement des neutrophiles chez des souris déficientes en TLR4 ou chez des souris sauvages traitées avec un inhibiteur de CXCR2 était associée à une diminution de l'inflammation éosinophilique, des IgE, des cytokines Th2 et de la sécrétion de mucus (Hosoki et al., 2015). Dans la même étude, le transfert de neutrophiles provenant de souris sauvages dans la trachée de souris déficientes en TLR4 était suffisant pour restaurer la réponse immunitaire Th2 et les caractéristiques de l'allergie respiratoire dans ce modèle, appuyant l'hypothèse selon laquelle les neutrophiles peuvent faciliter la sensibilisation allergique et l'inflammation (Hosoki et al., 2015). De manière surprenante, dans une étude clinique incluant des enfants japonais avec une neutropénie auto-immune primaire, l'incidence de l'asthme chez les enfants « déficients en neutrophiles » était significativement plus basse que chez des enfants ne souffrant pas de neutropénie, et atteignait des taux normaux lors de la résolution de la neutropénie (Yasui et al., 2005), supportant que les neutrophiles peuvent promouvoir l'asthme chez l'homme également.

Parmi la série de produits dérivés des neutrophiles, certains ont été identifiés comme étant présents à des taux élevés dans les voies aériennes des patients asthmatiques et pouvant contribuer à la pathogénie de la maladie. Suite à une stimulation *ex vivo* à l'aide d'un allergène relevant, la libération de MMP-9 et la production de ROS étaient augmentées au niveau des neutrophiles de patients souffrant d'asthme allergique par rapport à ceux de patients sains (Monteseirín et al., 1996; Ventura et al., 2014). Afin de déterminer le rôle de la MMP-9 et des ROS *in vivo*, des souris transgéniques chez lesquelles la MMP-9 ou la production de ROS étaient supprimées ont été soumises à un modèle d'asthme allergique basé sur l'administration d'ovalbumine (OVA) couplée à un adjuvant des réponses Th2, l'alun (Cataldo et al., 2002; Sevin et al., 2013; Vermaelen et al., 2003). Suite à la réexposition à l'allergène, les souris déficientes en MMP-9 montraient un recrutement de cellules inflammatoires compromis, accompagné

d'une hyperréactivité bronchique diminuée, moins d'IL-13 et d'IgE spécifiques de l'OVA (Cataldo et al., 2002; Vermaelen et al., 2003). Par ailleurs, Vermaelen et collègues ont observé une déficience de la migration et de la maturation des CD4 au niveau des poumons des souris déficientes en MMP-9, ce qui peut expliquer l'altération du développement de l'allergie respiratoire médiée par une réponse immunitaire Th2 (Vermaelen et al., 2003). De manière similaire, les souris dépourvues de ROS ne développent pas d'inflammation éosinophilique, de sécrétion de mucus ni d'IL-13 (Sevin et al., 2013). De plus, la capacité des splénocytes à sécréter de l'IL-13 suite à une stimulation *ex vivo* était également entravée, soutenant un rôle des ROS dans l'induction des réponses Th2 (Sevin et al., 2013).

Les neutrophiles représentent une source majeure d'oncostatine M, un acteur important des dysfonctions au niveau des barrières muqueuses (Pothoven et al., 2015) chez les patients asthmatiques (Pothoven et al., 2017). La contribution exacte de l'oncostatine M à l'asthme allergique n'est pas encore claire mais une injection endotrachéale d'adénovirus codant pour l'oncostatine M à des souris est suffisante pour induire les caractéristiques de l'asthme allergique (Fritz et al., 2011).

Durant la phase de réexposition allergénique dans un modèle d'asthme dont la sensibilisation est basée sur une injection d'OVA-Alun, l'inhibition de NE était associée à une diminution du nombre de cellules à mucus, du recrutement des éosinophiles, de l'hyperréactivité bronchique et de la réponse Th2 (Koga et al., 2013). De plus, des souris exposées de manière chronique à de la NE développaient une métaplasie des cellules à mucus et une inflammation éosinophilique pulmonaire (Voynow et al., 2004). *In vitro*, la NE peut induire l'expression de la protéine de mucine MUC5AC par des cellules épithéliales humaines (Kohri et al., 2002; Shao and Nadel, 2005).

Dans une étude récente, les NETs ont été démontré comme éléments essentiels dans l'induction des exacerbations de l'asthme allergique induites par le rhinovirus (Toussaint et al., 2017). En effet, les NETs étaient massivement libérés dans les poumons de souris infectées par le rhinovirus, et l'inhibition de la formation ou la dégradation des NETs entraînait une forte diminution de toutes les caractéristiques des exacerbations allergiques (Toussaint et al., 2017). De plus, dans ce modèle, une injection d'ADN double brin murin, un composant majeur des NETs, suffisait à restaurer la plupart des caractéristiques de l'exacerbation. Mécanistiquement, les NETs favorisaient le recrutement des moCDs au niveau du poumon, ces moCDs peuvent être impliquées dans la phase de réactivation de la réponse Th2 face à des extraits d'acariens (Plantinga et al., 2013; Toussaint et al., 2017). Durant l'exacerbation de l'asthme allergique induite par le rhinovirus chez l'homme, les niveaux d'ADN double brin étaient étroitement corrélés avec les niveaux de NE dans le lavage bronchoalvéolaire, les taux de cytokines de type 2 détectées dans le lavage nasal et le lavage bronchoalvéolaire et avec la sévérité clinique des exacerbations (Toussaint et al., 2017) (Figure 10).

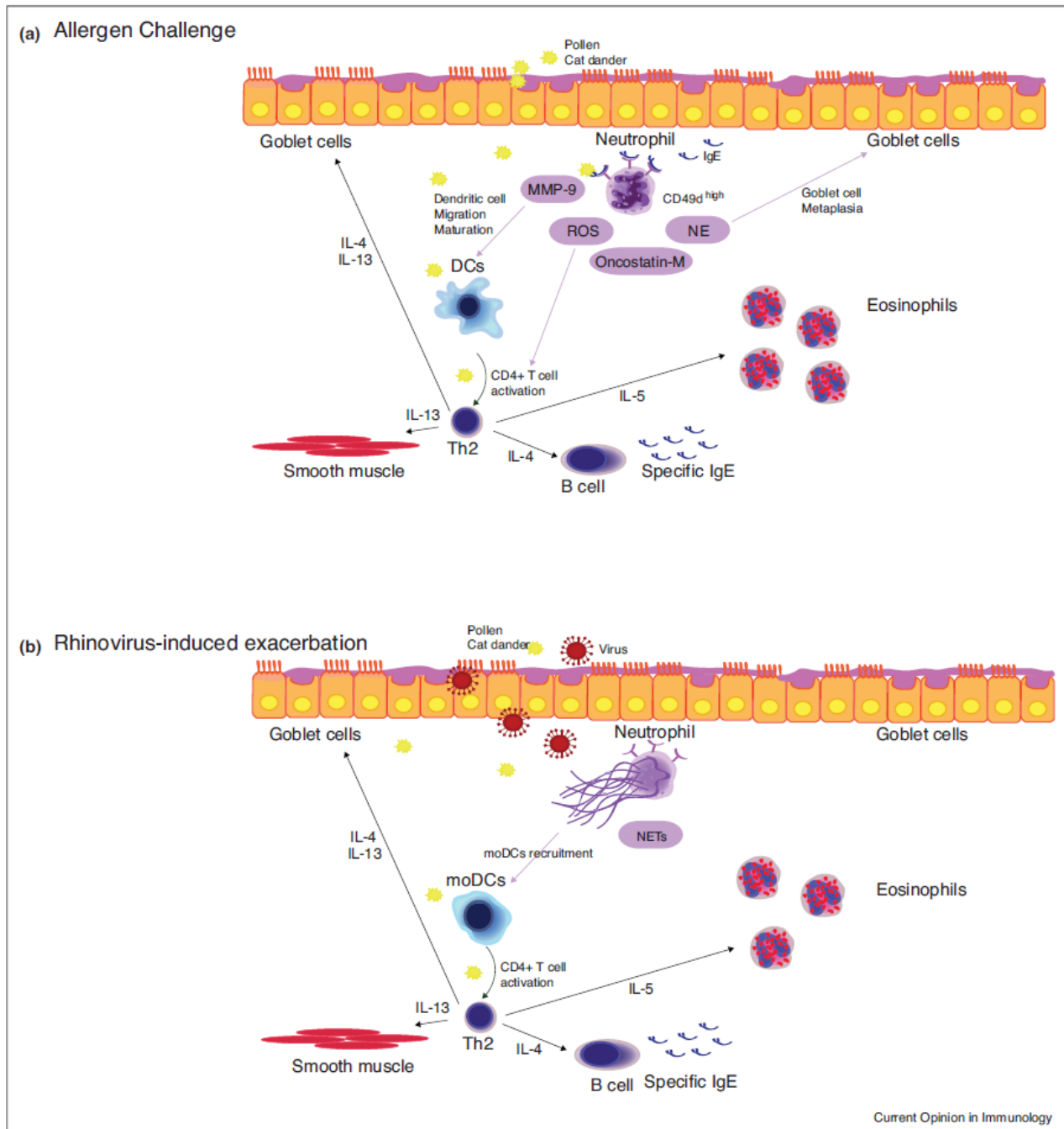


Figure 10. Contribution des neutrophiles à l'asthme allergique. A. Suite à un challenge allergénique, les neutrophiles sont les premières cellules immunitaires innées à être recrutées dans les voies respiratoires. Ils sont capables de sécréter de la matrix metalloproteinase 9 (MMP-9), des produits dérivés de l'oxygène (ROS), de l'oncostatine-M, et de la NE, parmi d'autres via des mécanismes IgE-dépendants. MMP-9 induit le recrutement et la maturation des cellules dendritiques pulmonaires, qui médie la sensibilisation allergique. Les ROS peuvent promouvoir ou faciliter l'activation des lymphocytes T CD4 naïfs. L'oncostatine-M a un effet global sur les caractéristiques de l'asthme. La NE peut stimuler la métaplasie des cellules à mucus. B. Durant l'exacerbation de l'asthme allergique induite par les virus respiratoires, les neutrophiles libèrent des NETs, qui attirent les moDCs dans le poumon et induisent les exacerbations. (Radermecker et al., 2018)

Objectifs

Objectifs

Ces dernières années, l'asthme allergique est devenu un problème de santé publique majeur dans les pays occidentaux, industrialisés, affectant 300 millions de personnes à travers le monde (Holgate, 2010). La pathogénie de la maladie est relativement bien décrite et est basée sur le développement d'une réponse immunitaire de type 2 aberrante dirigée envers un antigène environnemental inoffensif, aussi appelé allergène (Locksley, 2010). Cependant, son étiologie reste largement incomprise. Une prédisposition génétique peut influencer le développement de la maladie (Vercelli, 2008) mais ne permet pas d'expliquer l'augmentation rapide de la prévalence de cette dernière ces 50 dernières années dans les pays industrialisés. En effet, des études épidémiologiques ont identifié des environnements particuliers associés à une augmentation du risque de développer la maladie. Les modes de vie urbains, associés à une diminution de l'exposition à des agents pathogènes et leurs dérivés, tels que le LPS (Lambrecht and Hammad, 2017; Liu, 2002), les infections virales respiratoires (Bønnelykke et al., 2015; Busse et al., 2010b) et la pollution de l'air ambiant (Kim et al., 2011; Zu et al., 2018) ont tous été identifiés comme constituant des facteurs de risque importants au développement de la maladie. Jusqu'à présent, le lien mécanistique entre ces différents environnements et l'augmentation de la susceptibilité à l'asthme allergique n'a pas été élucidé. L'identification de ce mécanisme d'action pourrait ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques dans le traitement de l'asthme allergique.

Les neutrophiles sont depuis longtemps considérés comme les premières cellules immunitaires innées recrutées suite à une infection (Nauseef and Borregaard, 2014). Ils sont également décrits comme cellules effectrices dans les réponses immunitaires Th17 (Leliefeld et al., 2015). Cependant, l'identification récente de nouvelles fonctions et de l'étonnante complexité de la biologie des neutrophiles suggère des rôles encore inconnus de ces cellules (Liew and Kubes, 2019). De plus, les neutrophiles ont souvent été associés à l'asthme allergique, principalement lors de la phase de réexposition, mais leur rôle dans cette pathologie a été très superficiellement investigué (Radermecker et al., 2018).

Dans cette étude, notre objectif a été d'investiguer, chez la souris, les modifications du système immunitaire inné, et en particulier des neutrophiles, suite à l'exposition à ces différents environnements pro-allergiques mais également suite à l'exposition à des doses élevées de LPS, connues pour conférer une certaine protection contre le développement de l'asthme allergique. Nous avons ensuite étudié la contribution potentielle des neutrophiles et des NETs à la susceptibilité à développer de l'asthme allergique dans ces trois modèles distincts.

Section expérimentale

Section expérimentale

Etude 1 :

Locally instructed CXCR4^{hi} neutrophils trigger environment-driven allergic asthma through the release of neutrophil extracellular traps

Section expérimentale

Etude 1 :

Locally instructed CXCR4^{hi} neutrophils trigger environment-driven allergic asthma through the release of neutrophil extracellular traps

<i>Nature Immunology</i> : 20 , 1444-1455, 2019
--

Coraline Radermecker, Catherine Sabatel, Céline Vanwinge, Cecilia Ruscitti, Joey Schyns, Pauline Maréchal, Natacha Rocks, Fabienne Perin, Marie Toussaint, Didier Cataldo, Sebastian L Johnston, Fabrice Bureau, Thomas Marichal

Locally instructed CXCR4^{hi} neutrophils trigger environment-driven allergic asthma through the release of neutrophil extracellular traps

Coraline Radermecker^{1,2,3,9}, Catherine Sabatel^{1,3,9}, Céline Vanwinge⁴, Cecilia Ruscitti^{2,3},
Pauline Maréchal^{2,3}, Fabienne Perin⁴, Joey Schyns^{1,2,3}, Natacha Rocks⁴, Marie Toussaint^{5,6},
Didier Cataldo⁴, Sebastian L Johnston^{5,6,7}, Fabrice Bureau^{1,3,8,10*} and Thomas Marichal^{1,2,3,8,10*}

Low exposure to microbial products, respiratory viral infections and air pollution are major risk factors for allergic asthma, yet the mechanistic links between such conditions and host susceptibility to type 2 allergic disorders remain unclear. Through the use of single-cell RNA sequencing, we characterized lung neutrophils in mice exposed to a pro-allergic low dose of lipopolysaccharide (LPS) or a protective high dose of LPS before exposure to house dust mites. Unlike exposure to a high dose of LPS, exposure to a low dose of LPS instructed recruited neutrophils to upregulate their expression of the chemokine receptor CXCR4 and to release neutrophil extracellular traps. Low-dose LPS-induced neutrophils and neutrophil extracellular traps potentiated the uptake of house dust mites by CD11b⁺Ly-6C⁺ dendritic cells and type 2 allergic airway inflammation in response to house dust mites. Neutrophil extracellular traps derived from CXCR4^{hi} neutrophils were also needed to mediate allergic asthma triggered by infection with influenza virus or exposure to ozone. Our study indicates that apparently unrelated environmental risk factors can shape recruited lung neutrophils to promote the initiation of allergic asthma.

Exposure to naturally occurring aeroallergens such as house dust mites (HDM), pollens or animal dander can, in some predisposed individuals, lead to allergic sensitization and the development of allergic asthma, a major public-health problem with high socio-economic impacts^{1,2}. While genome-wide studies have discovered genetic polymorphisms associated with allergic susceptibility³, the worldwide increase in the prevalence of allergies over the last decades points towards a major contribution of the environment^{4,5}. Epidemiological studies have identified environmental risk factors for allergic asthma, including respiratory viral infections⁶, air pollutants⁷ or urban lifestyles associated with decreased exposure to microbes or their products such as bacterial endotoxins (LPS)^{8,9}. A better understanding of the mechanisms by which pro-allergic environmental conditions shape the lung immune system to initiate allergic airway responses is an unmet and urgent need that may open novel therapeutic avenues for allergic asthma.

Allergic airway inflammation, a cardinal feature of allergic asthma, is thought to result from an aberrant type 2 immune response directed against inhaled allergens^{10,11}. The initiation of type 2 immunity to HDM, a major allergen source in humans¹², involves sensing of LPS and HDM compounds by epithelial cells and the release of pro-allergic alarmins that instruct lung dendritic cells (DCs) to sample allergens, transport them to the draining lymph node (LN) and induce allergen-specific CD4⁺ type 2 helper T cells (T_H2 cells). On subsequent HDM challenge, T_H2 effector cells secrete type 2 cytokines such as IL-4, IL-5 and IL-13, which orchestrate features of allergic airway inflammation, including airway

eosinophilia and goblet cell metaplasia through IL-5- and IL-13-dependent mechanisms, respectively^{11,13}.

Neutrophils are known to function as first responders specialized in pathogen clearance and as prototypic effector cells of type 17 responses. However, new evidence points to the complexity and functional diversity of neutrophils^{14,15}. The role of neutrophils in asthma has mainly been investigated in severe asthma, which is characterized by a type 17-mediated neutrophilic inflammation^{16–19}. In type 2 allergic asthma, the role of neutrophils has been investigated in the effector phase but not the initiation phase of type 2 responses^{17,20}. Indeed, neutrophil-derived DNA found in neutrophil extracellular traps (NETs), which also contain modified histone proteins such as citrullinated histone H3 (Cit-H3) and granule proteins such as neutrophil elastase (NE) and myeloperoxidase (MPO)¹⁵, contributed to the manifestations of rhinovirus-induced allergic asthma exacerbations²⁰.

Here, using single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) and mouse models of allergic asthma triggered by three distinct pro-allergic environmental factors, we found that locally programmed, NET-releasing CXCR4^{hi} lung neutrophils acted as early triggers of type 2 allergic airway inflammation. Our results indicate that phenotypically and functionally distinct tissue neutrophils act as common determinants of environment-driven allergic asthma onset in mice.

Results

Low-dose LPS exposure potentiates HDM-induced allergic asthma. To investigate the mechanisms of environment-driven

¹Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, GIGA Institute, Liege University, Liege, Belgium. ²Laboratory of Immunophysiology, GIGA Institute, Liege University, Liege, Belgium. ³Faculty of Veterinary Medicine, Liege University, Liege, Belgium. ⁴Laboratory of Tumor and Development Biology, GIGA Institute, Liege University, Liege, Belgium. ⁵Airway Disease Section, National Heart and Lung Institute, Imperial College London, London, UK. ⁶Medical Research Council and Asthma UK Centre in Allergic Mechanisms of Asthma, London, UK. ⁷Imperial College Healthcare National Health Service Trust, London, UK. ⁸Wallonia Excellence in Life Sciences and Biotechnology, Wallonia, Belgium. ⁹These authors contributed equally: Coraline Radermecker, Catherine Sabatel. ¹⁰These authors jointly supervised this work: Fabrice Bureau, Thomas Marichal. *e-mail: fabrice.bureau@uliege.be; t.marichal@uliege.be

ARTICLES

NATURE IMMUNOLOGY

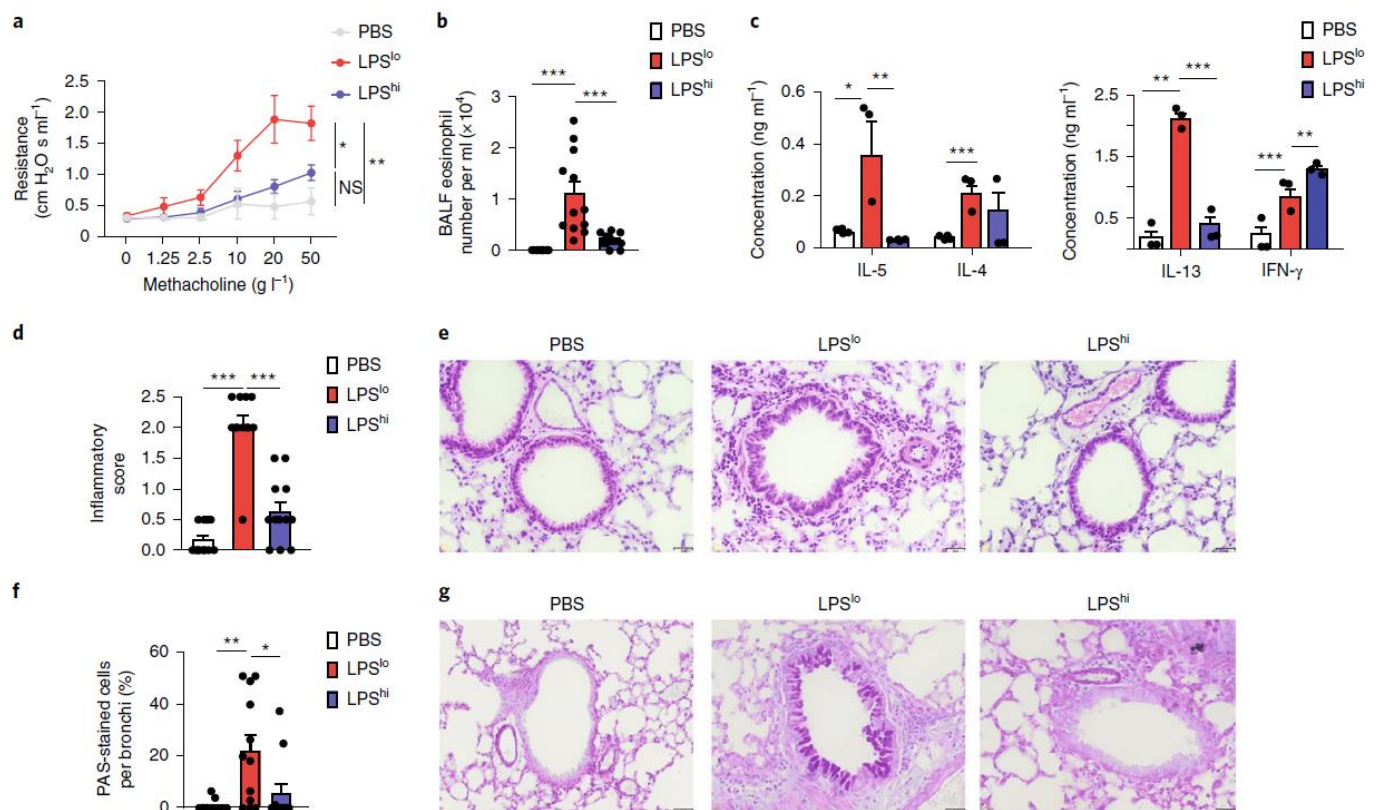


Fig. 1 | Pre-exposure to low-dose LPS potentiates HDM-induced type 2 allergic asthma. **a**, Invasive measurement of dynamic airway resistance on methacholine inhalation showing bronchial hyperreactivity in vehicle-HDM, LPS^{lo}-HDM and LPS^{hi}-HDM mice, assessed 3 d after the second HDM administration. **b**, Eosinophil cell counts in the BALF of mice, as in **a**. **c**, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) measurement of cytokine production by HDM-restimulated bronchial LN (BLN) cells of mice, as in **a**. **d**, Inflammatory score estimating perivascular and peribronchial inflammation, quantified from H&E-stained lung sections of mice, as in **a**. **e**, Representative hematoxylin and eosin (H&E) staining of lung sections of mice as in **a**. **f**, Quantification of PAS-stained epithelial cells per bronchi showing airway mucus production in mice, as in **a**. **g**, Representative PAS staining of lung sections of mice, as in **a**. **a–d,f**, Data show mean ± s.e.m. and are pooled from 2 independent experiments ($n = 6$ mice per group) (**a**) or ≥ 3 independent experiments (**b–d,f**), each symbol representing individual mice (**b,d,f**) ($n = 12$ per group) or independent experiments in which cells from 4 mice were pooled by group (**c**). P values were calculated using a mixed-effects model with Geisser greenhouse correction (**a**) or a one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's post hoc test (**b–d,f**). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. NS, not significant. Scale bar, 32 μ m.

initiation of allergic asthma in mice, we used a model of exposure to HDM in mice pre-exposed to a pro-allergic environmental factor, namely a low dose of LPS²¹. Different doses of LPS, ranging from 0.1 ng to 10 μ g, were administered intranasally (i.n.) to groups of BALB/c mice, which were exposed 1 and 8 d later to 40 and 10 μ g of HDM i.n., respectively. At day 11, airway eosinophilia, a feature of type 2 allergic asthma¹¹, was virtually absent in vehicle pre-exposed HDM-treated mice, but it reached a peak in mice pre-exposed to 100 ng of LPS and returned to baseline with 10 μ g of LPS (Supplementary Fig. 1a,b). Single exposures to either 100 ng or 10 μ g of LPS were chosen to model a pro-allergic, 'hygienic' (LPS^{lo}) or a protective²², 'nonhygienic' (LPS^{hi}) environment, respectively. LPS^{lo} mice treated with HDM (LPS^{lo}-HDM mice) developed features of allergic asthma 3 d after the second HDM instillation, including increased bronchial hyperreactivity to methacholine (Fig. 1a), airway eosinophilia (Fig. 1b), a higher secretion of IL-4, IL-5 and IL-13 by total LN cells restimulated with HDM (Fig. 1c), perivascular and peribronchial leukocyte infiltration (Fig. 1d,e), and increased bronchial mucus production (Fig. 1f,g) when compared to vehicle-HDM or LPS^{hi}-HDM mice. Of note, CD45⁺CD11b^{hi}Ly-6G^{hi} neutrophils, quantified by flow cytometry, were massively recruited into the lungs of LPS^{lo} and LPS^{hi} mice between 6 and 24 h after LPS exposure (Supplementary Fig. 1c,d). Thus, low-dose exposure to LPS induced a lung environment that promoted type 2 immunity to HDM and the development of allergic asthma.

scRNA-seq identifies particular neutrophils in LPS^{lo} mice. To investigate the transcriptional diversity of lung neutrophils, we performed scRNA-seq. Twenty-four hours after vehicle, LPS^{lo} and LPS^{hi} i.n., neutrophils were first enriched from lung single-cell suspensions pooled from 3 BALB/c mice per condition by negative selection with MACS and were then FACS sorted as CD45⁺ cells (Supplementary Fig. 2a–c). With the 10x Genomics platform²³, cells were subjected to single-cell droplet encapsulation, scRNA-seq and quality-control filtering (Supplementary Fig. 2d,e). A total of 1,406, 2,146 and 2,746 cells were analyzed in vehicle, LPS^{lo} and LPS^{hi} mice, respectively. Nonlinear dimensional reduction and graph-based clustering of single cells pooled from vehicle, LPS^{lo} and LPS^{hi} mice identified 6 transcriptionally distinct clusters of neutrophils, all characterized by high expression of *S100a8*, *S100a9* and *Csf3r* transcripts (cluster 0 through cluster 5; Fig. 2a and Supplementary Fig. 2f,g). Neutrophils from vehicle lungs were grouped in one cluster (cluster 0; Fig. 2b–d and Supplementary Fig. 3a–d), while neutrophils from LPS^{lo} and LPS^{hi} mice were segregated into five additional clusters (clusters 1–5, Fig. 2b–d). Neutrophils in cluster 1 were almost uniquely found in lungs from LPS^{lo} mice, while neutrophils in clusters 2, 3 and 5 were nearly exclusively present in lungs from LPS^{hi} mice, and neutrophils in cluster 4 were equally distributed between LPS^{hi} and LPS^{lo} mice (Fig. 2b–d). We performed a differential expression analysis, and we defined a common,

dose-independent, LPS-induced signature as the list of transcripts that were commonly upregulated in each of the clusters 1 to 5 as compared to cluster 0 (Supplementary Fig. 3e,f). We then identified LPS^{lo} or LPS^{hi} signatures as the lists of transcripts that were upregulated in cluster 1 or clusters 2, 3 and 5, respectively, as compared to cluster 0, and that were absent from the common LPS signature. *Cxcr4* and *Lamp-1* transcripts, which code for proteins detectable by flow cytometry, were significantly upregulated in LPS^{lo} neutrophils as compared to LPS^{hi} neutrophils (Fig. 2e). The LPS^{lo} signature comprised 25 transcripts that were enriched in processes such as complement receptor-mediated signaling pathways (*Fpr1*, *Fpr2*) and response to type 1 or type 2 interferon (IFN) (*Ifitm1*, *Ifitm3*, *Ifi47*) based on Gene Ontology analysis (Fig. 2e–g). The LPS^{lo} signature contained 97 transcripts that were enriched in genes involved in endoplasmic reticulum stress (*Atf3*, *Atf4*, *Bax*), reactive oxygen species synthesis (*Ptgs2*, *Arg2*, *Il1b*), oxidative stress (*Rps3*, *Prdx6*, *Jun*) and ERK1/2 signaling cascade (*Cd74*, *C3*, *Hmgbl1*) (Fig. 2e,f,h), responses that have all been implicated in the formation and release of NETs^{15,24}. Thus, lung neutrophils induced by a pro-allergic, low dose of LPS are transcriptionally distinct from those induced by a high LPS dose.

LPS^{lo} locally triggers NET-releasing CXCR4^{hi} neutrophils. To validate the scRNA-seq findings and identify the neutrophils induced by LPS^{lo} treatment in vivo, we exposed BALB/c mice to vehicle, LPS^{lo} or LPS^{hi} treatment and assessed the expression of CXCR4 and Lamp-1 on lung CD45⁺CD11b^{hi}Ly-6G^{hi} neutrophils 24 h later. We found a significant upregulation of CXCR4 and Lamp-1 on lung neutrophils from LPS^{lo} mice as compared to neutrophils from vehicle or LPS^{hi} mice (Fig. 3a,b). The expression of CD49d, an integrin reported to be highly expressed on CXCR4^{hi} blood neutrophils²⁵, was also upregulated on lung neutrophils from LPS^{lo} mice (Fig. 3a,b). Next, we performed time-course analyses of CXCR4 expression on bone marrow (BM), blood and lung CD45⁺CD11b^{hi}Ly-6G^{hi} neutrophils isolated 6, 12, 18, 24 and 48 h after treatment in vehicle, LPS^{lo} and LPS^{hi} mice. In the lung, CXCR4 expression on CD45⁺CD11b^{hi}Ly-6G^{hi} neutrophils started to increase 18 h after LPS^{lo}, reached a peak at 24 h and returned to baseline after 48 h (Fig. 3c). Expression of CXCR4 on lung CD45⁺CD11b^{hi}Ly-6G^{hi} neutrophils from LPS^{hi} mice was similar to that of vehicle mice (Fig. 3c). Of note, while we detected a rhythmic oscillation in the expression of CXCR4 on blood neutrophils²⁶, the oscillation was not affected by treatment with LPS, regardless of the dose (Fig. 3c). Expression of CXCR4 on BM CD45⁺CD11b^{hi}Ly-6G^{hi} neutrophils was similar in LPS^{lo} and vehicle mice (Fig. 3c), indicating that low-dose LPS administered i.n. instructs the neutrophils locally and not at distant sites. Morphologically, CXCR4^{hi}CD49d^{hi} neutrophils sorted from the lungs of LPS^{lo} mice were smaller and displayed a higher nucleus/cytoplasm ratio and a hypersegmented nucleus compared to lung CXCR4^{lo}CD49d^{lo} neutrophils from LPS^{hi} mice (Fig. 3d and Supplementary Fig. 4a–d).

Lung CXCR4^{hi}CD49d^{hi} neutrophils sorted from LPS^{lo} mice released NETs ex vivo, while lung CXCR4^{lo}CD49d^{lo} neutrophils from vehicle or LPS^{hi} mice did not (Fig. 3e and Supplementary Fig. 4e–g). In addition, the amount of free double-stranded DNA (dsDNA) and of NE–DNA complexes, which are characteristic of NETs¹⁵, were higher in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of LPS^{lo} mice 24 h after LPS than in the vehicle and LPS^{hi} mice (Fig. 3f,g), while the amounts of Cit-H3, a modified form of histone H3 implicated in chromatin decondensation and NET formation¹⁵, were specifically increased in the lungs of LPS^{lo} mice (Fig. 3h,i). High-resolution confocal microscopy indicated the presence of extracellular MPO⁺Cit-H3⁺ NETs in the lungs of LPS^{lo} mice, unlike in vehicle or LPS^{hi} mice (Fig. 3j,k). Notably, neutrophil depletion with an antibody against Ly-6G was associated with an absence of NETs 24 h after LPS in the lungs of anti-Ly-6G-treated LPS^{lo} mice (Supplementary Fig. 5), indicating that NETs were exclusively derived from neutrophils. Concordant with the upregulation of CXCR4, NETs were detected at 18 h after low-dose LPS, but not detected after 48 h (Supplementary Fig. 6a,b). These observations indicate that neutrophils recruited to the lungs of LPS^{lo} mice had a CXCR4^{hi}CD49d^{hi}Lamp-1^{hi} phenotype that was only detected in the lungs, and were prone to release NETs, while lung neutrophils recruited in LPS^{hi} mice were phenotypically similar to steady-state neutrophils and did not release NETs.

CXCR4^{hi} neutrophils and NETs trigger allergic airway inflammation in LPS^{lo} mice. To address whether the effect of low-dose LPS on HDM-induced allergic airway inflammation was mediated by neutrophils, LPS^{lo}-HDM mice were administered Sch527123, an antagonist of the chemokine receptor CXCR2 (anti-CXCR2) (ref. ²⁷), orally 2 h before and 4 and 8 h after LPS^{lo}, and 2 h before and 4 h after i.n. administration of 40 µg of HDM, to inhibit the LPS-induced neutrophil recruitment to the lung²⁸. Treatment with anti-CXCR2 significantly reduced numbers of lung CD45⁺CD11b^{hi}Ly-6G^{hi} neutrophils 24 h after LPS treatment in LPS^{lo} mice (Fig. 4a,b). LPS^{lo}-HDM mice treated with anti-CXCR2 had significantly reduced airway eosinophilia (Fig. 4c), HDM-specific type 2 immune responses (Fig. 4d), perivascular and peribronchial inflammation (Fig. 4e,f) and mucus cell production (Fig. 4g,h) compared to vehicle LPS^{lo}-HDM mice. In a different approach, we isolated lung neutrophils from vehicle, LPS^{lo} or LPS^{hi} mice by MACS negative selection and FACS CD45⁺ sorting 24 h after LPS (vehicle, LPS^{lo} and LPS^{hi} neutrophils, respectively) and adoptively transferred 5 × 10⁵ neutrophils in the trachea of naive recipients together with 40 µg of HDM, which were exposed to 10 µg of HDM i.n. 7 d later and analyzed 11 d after transfer. Transfer of LPS^{lo} neutrophils was sufficient to trigger airway eosinophilia (Fig. 4i), HDM-specific type 2 immunity (Fig. 4j), peribronchial inflammation (Fig. 4k,l) and increased mucus production (Fig. 4m,n) in HDM-treated recipient mice, while all these features were significantly lower in mice that received vehicle or LPS^{hi} neutrophils.

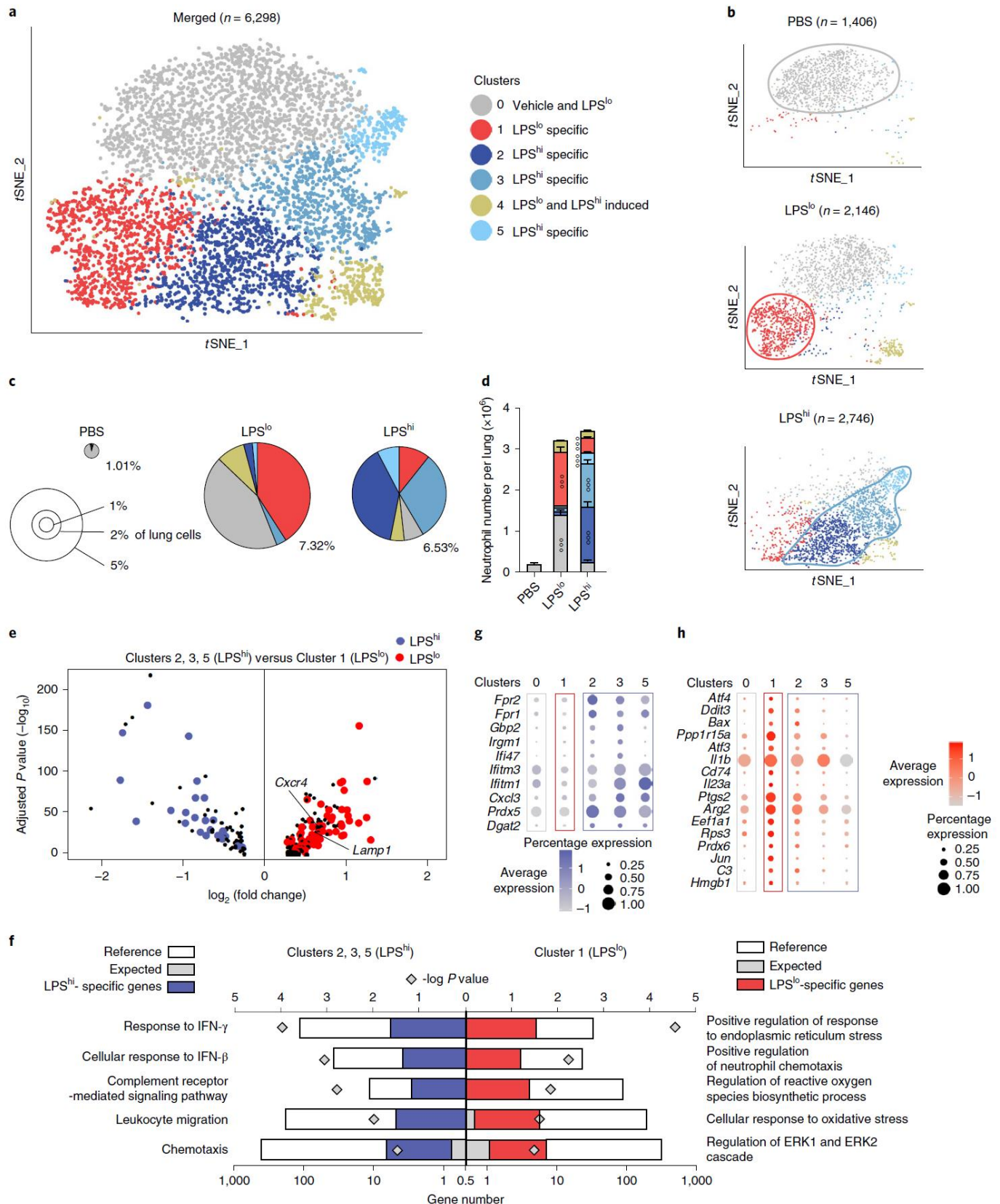
Fig. 2 | ScRNA-seq analysis of the lung neutrophil compartment 24 h after pro-allergic low or protective high LPS exposure. **a**, tSNE plots depicting the transcriptional identity of lung neutrophils merged from vehicle, LPS^{lo} and LPS^{hi} mice 24 h after treatment, analyzed by scRNA-seq ($n = 3$ pooled mice per group). **b**, tSNE plots depicting the transcriptional identity of lung neutrophils from the three separate experimental conditions, as in **a**. **c**, Pie charts depicting the relative contribution of each neutrophil cluster to the pool of neutrophils in lungs of mice, as in **a**. Insets indicate average percentage of neutrophils among total lung cells. **d**, Absolute numbers of lung neutrophils per cluster in mice, as in **a**. **e**, Volcano plot depicting the differentially expressed genes between LPS^{hi} and LPS^{lo} lung neutrophils of mice, as in **a**. Transcripts characteristic of the common LPS, the LPS^{lo}- and LPS^{hi}-specific signatures are colored in black, red and blue, respectively. **f**, PANTHER GO enrichment tests on the genes of the LPS^{hi} (left) and LPS^{lo} (right) signatures. **g**, **h**, Dot plots showing average expression of genes of the LPS^{hi} (**g**) and LPS^{lo} (**h**) signatures within neutrophil clusters. **d**, Data show mean + s.e.m. ($n = 3$ mice per group). P values were calculated with a two-way ANOVA with Tukey's *post hoc* test (**d**), a likelihood ratio test based on zero-inflated data to identify positive and negative markers of a single cluster compared to some or all other clusters (**e**) or a two-tailed Mann-Whitney U -test with Benjamini–Hochberg false discovery rate (FDR) correction (**f**). The symbol ° within a given cluster in **d** indicates that neutrophil numbers in that cluster are significantly different from the ones of the same cluster in the two other experimental conditions. °°° $P < 0.001$.

ARTICLES

NATURE IMMUNOLOGY

To test the contribution of NETs to the initiation of allergic airway inflammation in LPS^{lo}-HDM mice, we targeted the NETs with 4 daily intraperitoneal (i.p.) injections of DNase, which degrades NETs^{20,29}, starting 1 d before LPS^{lo} treatment, or with

8 i.p. injections of either the NE inhibitor GW-311616 (NEi)¹⁵ or an inhibitor of the arginine deiminase PAD4 (Cl-amidine)³⁰, every 12 h starting 1 d before LPS^{lo} treatment. Treatments with DNase, NEi and Cl-amidine resulted in a significant decrease of



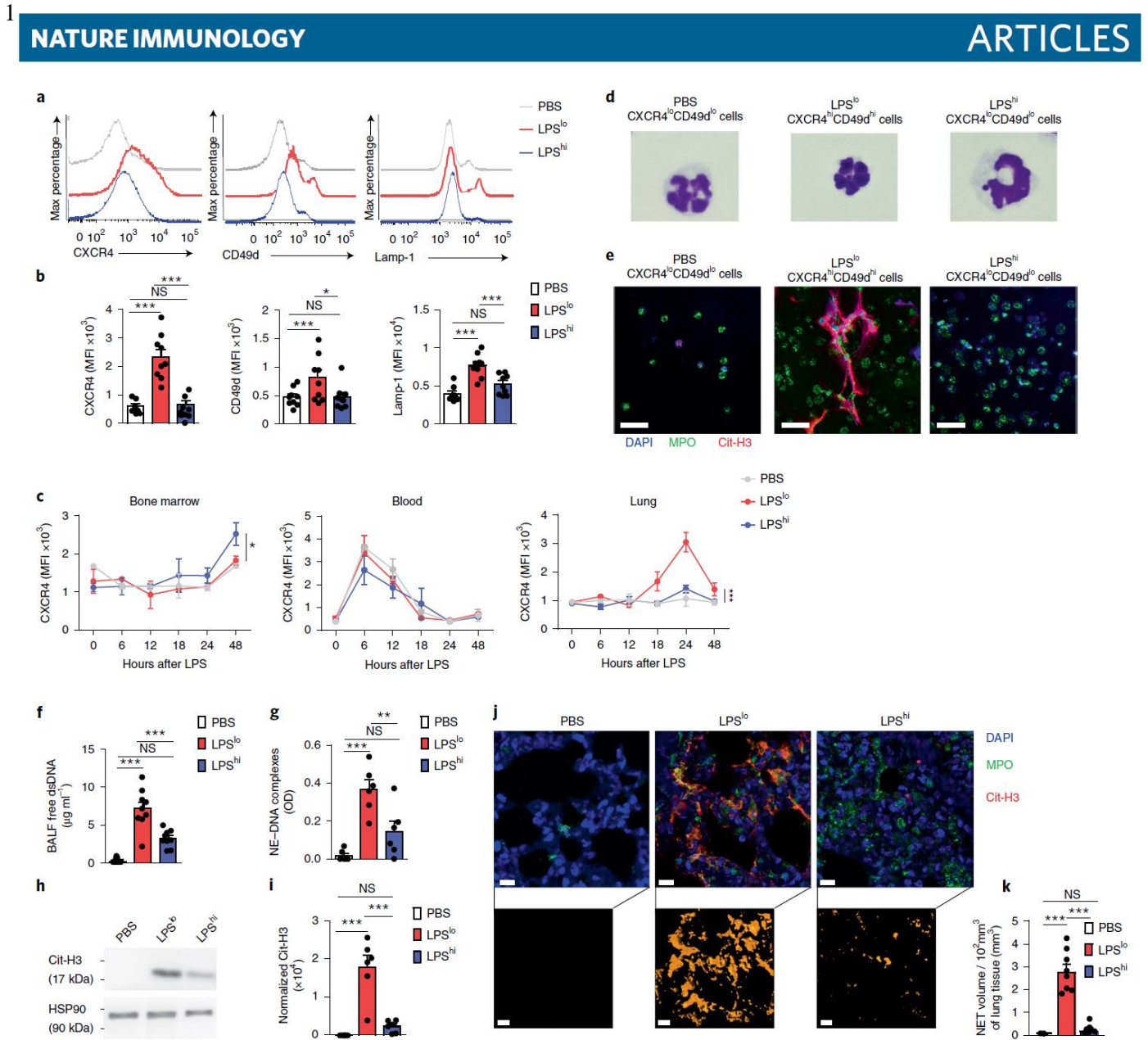


Fig. 3 | Pro-allergic low-dose LPS instructs lung neutrophils to upregulate CXCR4, CD49d and Lamp-1 and release NETs. a, Representative histograms of CXCR4, CD49d and Lamp-1 expression by lung CD45⁺CD11b^{hi}Ly-6G^{hi} neutrophils from vehicle, LPS^{lo} and LPS^{hi} mice 24 h after treatment. **b**, MFI showing quantification of CXCR4, CD49d and Lamp-1 expression by lung CD45⁺CD11b^{hi}Ly-6G⁺ neutrophils, as in **a**. **c**, Kinetic analysis of CXCR4 expression by bone marrow, blood and lung CD45⁺CD11b^{hi}Ly-6G^{hi} neutrophils from mice, as in **a**. **d**, Representative photographs of FACS-sorted CXCR4^{lo}CD49d^{lo}, CXCR4^{hi}CD49d^{hi} and CXCR4^{lo}CD49d^{lo} lung neutrophils from mice, as in **a**. **e**, Confocal microscopy stainings of Cit-H3⁺MPO⁺DAPI⁺ NETs released from ex vivo-cultured neutrophils, as in **d**. Pictures are representative of one of four independent sorting experiments. **f**, Levels of extracellular dsDNA in the BALF of vehicle, LPS^{lo} and LPS^{hi} mice 24 h after treatment. **g**, ELISA measurement of NE-DNA complexes in the BALF of mice, as in **f**. **h**, Representative blots of Cit-H3 and HSP90α (loading control) assessed by Western blot of lung protein extracts from mice, as in **f**. **i**, Quantification of normalized Cit-H3 levels in lung protein extracts of mice, as in **f**. **j**, Confocal microscopy stainings (top) and three-dimensional modeling (bottom) of Cit-H3⁺MPO⁺ NETs on lung sections of mice, as in **f**. Pictures are representative of one of more than 6 lungs analyzed. **k**, Quantification of NET volume in lung sections of mice, as in **f** ($n = 8$ mice per group). Data show mean + s.e.m and are pooled from 3 independent experiments (**b,f,g,i**) ($n = 9,9,6,6$ mice per group, respectively) or 2 independent experiments per time point analyzed (**c**) ($n = 3$ mice per time point). P values were calculated with a one-way ANOVA with Tukey's post hoc test. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. P values compare LPS^{lo} versus vehicle or LPS^{hi} mice in **c** (that is, treatment effect). OD, optical density; NS, not significant. Scale bar, 10 μ m.

NET volume in LPS^{lo} mice 24 h after LPS (Fig. 5a,b). Most features of type 2 allergic airway inflammation, such as airway eosinophilia (Fig. 5c), HDM-specific type 2 immunity (Fig. 5d), peribronchial inflammation (Fig. 5e,f) and increased mucus production (Fig. 5g,h) were significantly reduced in DNase-, NEi- or Cl-amidine-treated LPS^{lo}-HDM mice compared to vehicle LPS^{lo}-HDM mice, except for LN production of IL-4 and IL-13, which

was similar in DNase- and NEi-treated LPS^{lo}-HDM mice, respectively, compared to vehicle LPS^{lo}-HDM mice (Fig. 5d), and mucus production in NEi-treated LPS^{lo}-HDM mice compared to vehicle LPS^{lo}-HDM mice (Fig. 5g,h). These observations indicate that lung neutrophils and NETs from LPS^{lo} mice were mediating the pro-allergic effects of low-dose LPS on HDM-induced allergic asthma.

ARTICLES

NATURE IMMUNOLOGY

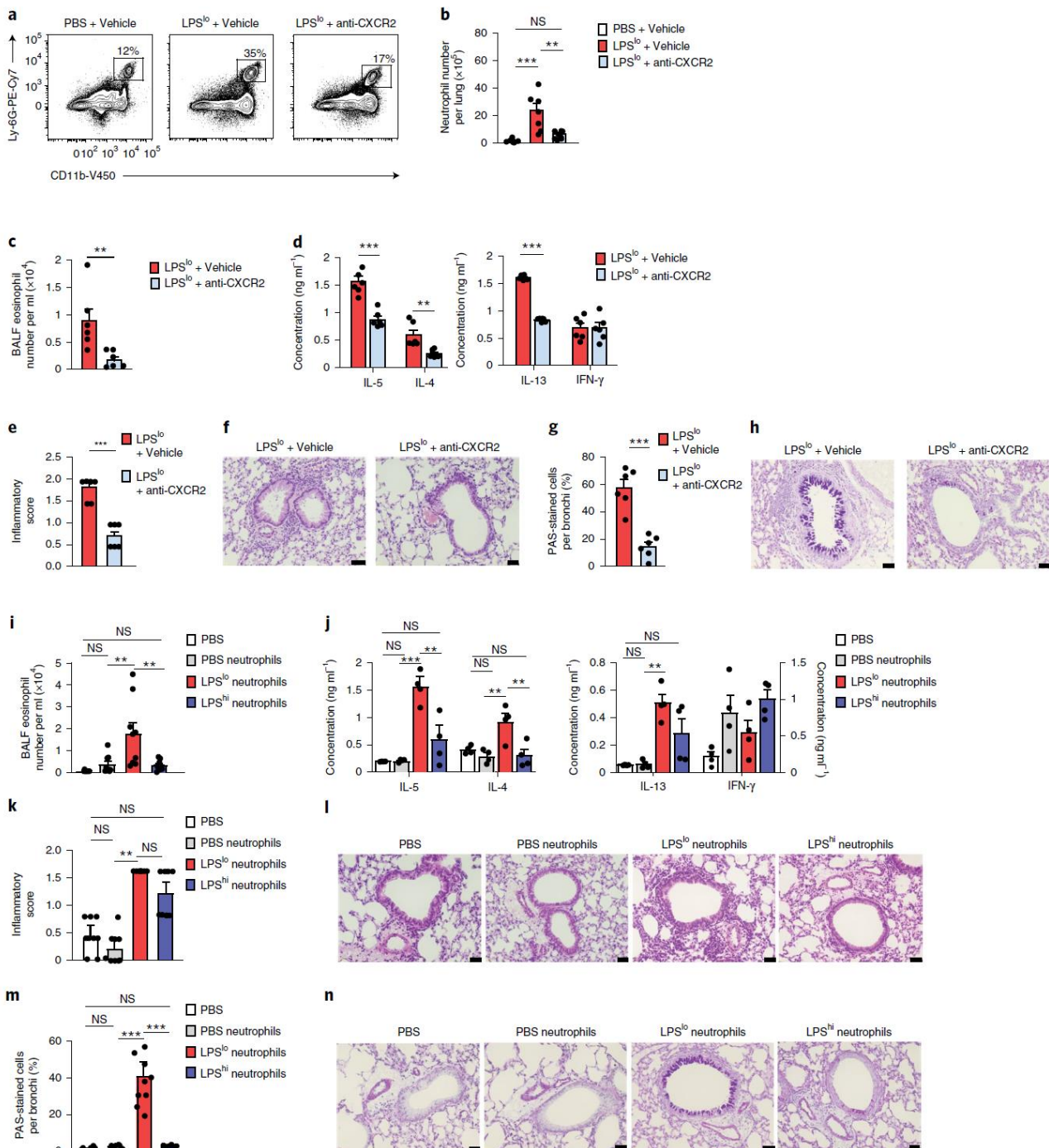


Fig. 4 | LPS^{lo} neutrophils mediate susceptibility to HDM-induced type 2 allergic airway inflammation. **a**, Representative dot plots of lung CD45⁺CD11b^{hi}Ly-6G^{hi} neutrophils from vehicle or LPS^{lo} mice treated or not with Sch527123, a CXCR2 antagonist (anti-CXCR2), 2 h before and 4, 8 and 20 h after LPS, and analyzed 24 h after LPS^{lo}. Insets indicate percentage of cells within the gate. **b**, Absolute numbers of lung CD45⁺CD11b^{hi}Ly-6G^{hi} neutrophils, as in **a**. **c**, Eosinophil cell counts in the BALF, assessed 3 d after the second HDM administration in LPS^{lo}-HDM mice treated or not with anti-CXCR2, 2 h before and 4 and 8 h after LPS^{lo}, and 2 h before and 4 h after i.n. sensitization with HDM. **d**, ELISA measurement of cytokine production by HDM-restimulated BLN cells of mice, as in **c**. **e**, Inflammatory score estimating perivascular and peribronchial inflammation, quantified from H&E-stained lung sections of mice, as in **c**. **f**, Representative H&E staining of lung sections of mice, as in **c**. **g**, Quantification of PAS-stained epithelial cells per bronchi showing airway mucus production in mice, as in **c**. **h**, Representative PAS staining of lung sections of mice, as in **c**. **i**, Eosinophil cell counts in BALF, assessed 3 d after the second HDM administration in mice transferred intratracheally with vehicle, LPS^{lo} and LPS^{hi} neutrophils and exposed to HDM. **j**, ELISA measurement of cytokine production by HDM-restimulated BLN cells of mice, as in **i**. **k**, Inflammatory score estimating perivascular and peribronchial inflammation, quantified from H&E-stained lung sections of mice, as in **i**. **l**, Representative H&E staining of lung sections of mice as in **i**. **m**, Quantification of PAS-stained epithelial cells per bronchi showing airway mucus production in mice, as in **i**. **n**, Representative PAS staining of lung sections of mice, as in **i**. (**b-e,g,i-k,m**, Data show mean + s.e.m. and are pooled from two independent experiments (**b-e,g**), each symbol representing individual mice ($n=6$ per group) or ≥ 3 independent experiments (**i-k,m**), each symbol representing individual mice ($n=9$ per group) (**i,k,m**) or independent experiments in which cells from 2–3 mice were pooled by group (**j**). *P* values were calculated with a one-way ANOVA with Tukey's *post hoc* test (**b-i,k,m**), a two-sided unpaired Student's *t*-test (**c**) or a two-sided Mann-Whitney test (**d-e,g**). **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001. NS, not significant. Scale bar, 32 μ m.

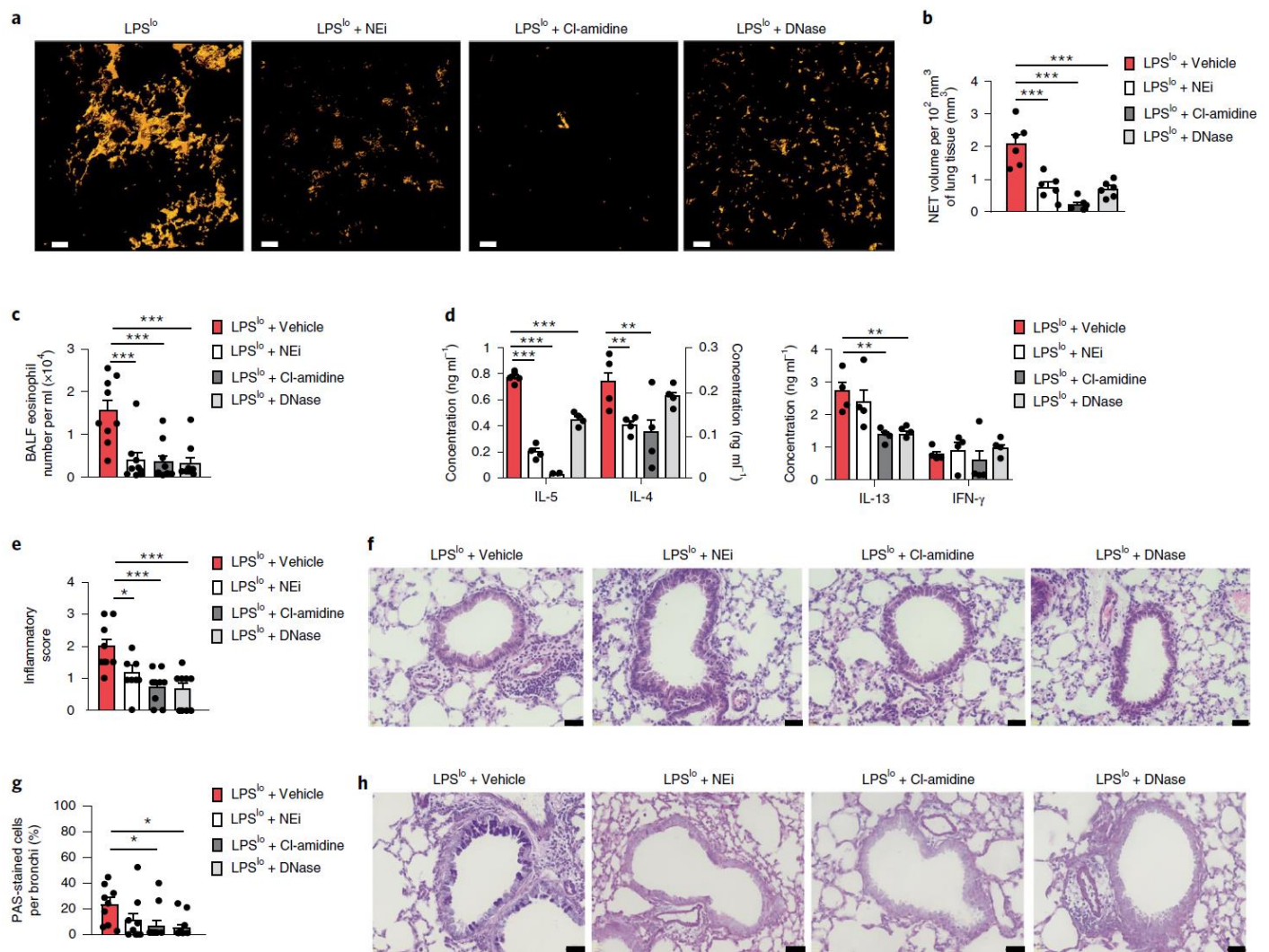


Fig. 5 | NETs mediate low-dose-LPS-triggered type 2 allergic airway inflammation to HDM. **a**, Three-dimensional modeling of Cit-H3⁺MPO⁺ NETs on lung sections, assessed 24 h after LPS^{lo} in mice treated i.p. with DNase 1 d before and at the time of LPS^{lo} treatment, or treated 4 times i.p. with NEi or Cl-amidine, every 12 h starting 1 d before LPS^{lo}. Pictures are representative of one of six lungs analyzed. **b**, Quantification of NET volume in lung sections of mice, as in **a**. **c**, Eosinophil cell counts in the BALF, assessed 3 d after the second HDM administration in LPS^{lo}-HDM mice treated i.p. with 4 daily injections of DNase, starting 1 d before LPS^{lo} treatment, or treated with 8 i.p. injections of NEi or Cl-amidine, every 12 hours starting 1 d before LPS^{lo} treatment. **d**, ELISA measurement of cytokine production by HDM-restimulated BLN cells of mice as in **c**. **e**, Inflammatory score estimating perivascular and peribronchial inflammation, quantified from H&E-stained lung sections of mice, as in **c**. **f**, Representative H&E staining of lung sections of mice, as in **c**. **g**, Quantification of PAS-stained epithelial cells per bronchi showing airway mucus production in mice, as in **c**. **h**, Representative PAS staining of lung sections of mice, as in **c**. Data show mean + s.e.m. as well as individual mice ($n = 6$ per group). **c–e,g**, Data show mean + s.e.m. and are pooled from 3–4 independent experiments, each symbol representing individual mice (**c,e,g**) ($n = 9$ per group) or independent experiments in which cells from 2–3 mice were pooled by group (**d**). P values were calculated with a one-way ANOVA with Tukey's post hoc test. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. Scale bars, 10 μm (**a**); 32 μm (**f,h**).

NETs promote HDM uptake by CD11b⁺Ly-6C⁺ DCs. Given the predominant role played by lung DCs in the induction of T_H2 responses to HDM^{31,32}, we looked at their ability to take up HDM on exposure to vehicle, LPS^{lo} or LPS^{hi}. Twenty-four hours after LPS, we administered 40 μg of fluorescent-labeled AF647-HDM i.n., and the numbers of lung CD45⁺CD11c^{hi}MHC-II^{hi}HDM⁺ DCs were quantified 24 h later by flow cytometry. Lungs of LPS^{lo} mice exposed to AF647-HDM had greater numbers of CD11b⁺Ly-6C⁺ DCs, and to a lesser extent CD11b⁺Ly-6C⁻ DCs, that were AF647-HDM⁺ than the lungs of vehicle or LPS^{hi} mice (Fig. 6a–c). Of note, the numbers of CD11b⁺Ly-6C⁺AF647-HDM⁺ DCs were significantly reduced in DNase-, NEi- or Cl-amidine-treated LPS^{lo}-AF647-HDM mice as compared to vehicle LPS^{lo}-AF647-HDM mice (Fig. 6d), suggesting that NETs promoted HDM uptake by CD11b⁺Ly-6C⁺ DCs directly or indirectly.

To assess whether LPS^{lo} neutrophils modulated AF647-HDM uptake by CD11b⁺Ly-6C⁺ DCs directly, we co-cultured vehicle, LPS^{lo} or LPS^{hi} neutrophils with bone marrow-derived DCs (BMDCs), which contained both CD11b⁺Ly-6C⁺ and CD11b⁺Ly-6C⁻ BMDCs (Fig. 6e) and are known to induce type 2 sensitization to HDM when pulsed with HDM and reinjected into recipient animals³³. Co-culture of AF647-HDM-treated BMDCs with LPS^{lo} neutrophils increased the uptake of AF647-HDM by CD11b⁺Ly-6C⁺ BMDCs, and to a lesser extent by CD11b⁺Ly-6C⁻ BMDCs, as compared to AF647-HDM-treated BMDCs alone (Fig. 6f). Co-culture of AF647-HDM-treated BMDCs with vehicle or LPS^{hi} neutrophils promoted a marginal increase in AF647-HDM uptake by CD11b⁺Ly-6C⁺ BMDCs compared to AF647-HDM-treated CD11b⁺Ly-6C⁺ BMDCs alone, which was significantly lower than that elicited by the co-culture

ARTICLES

NATURE IMMUNOLOGY

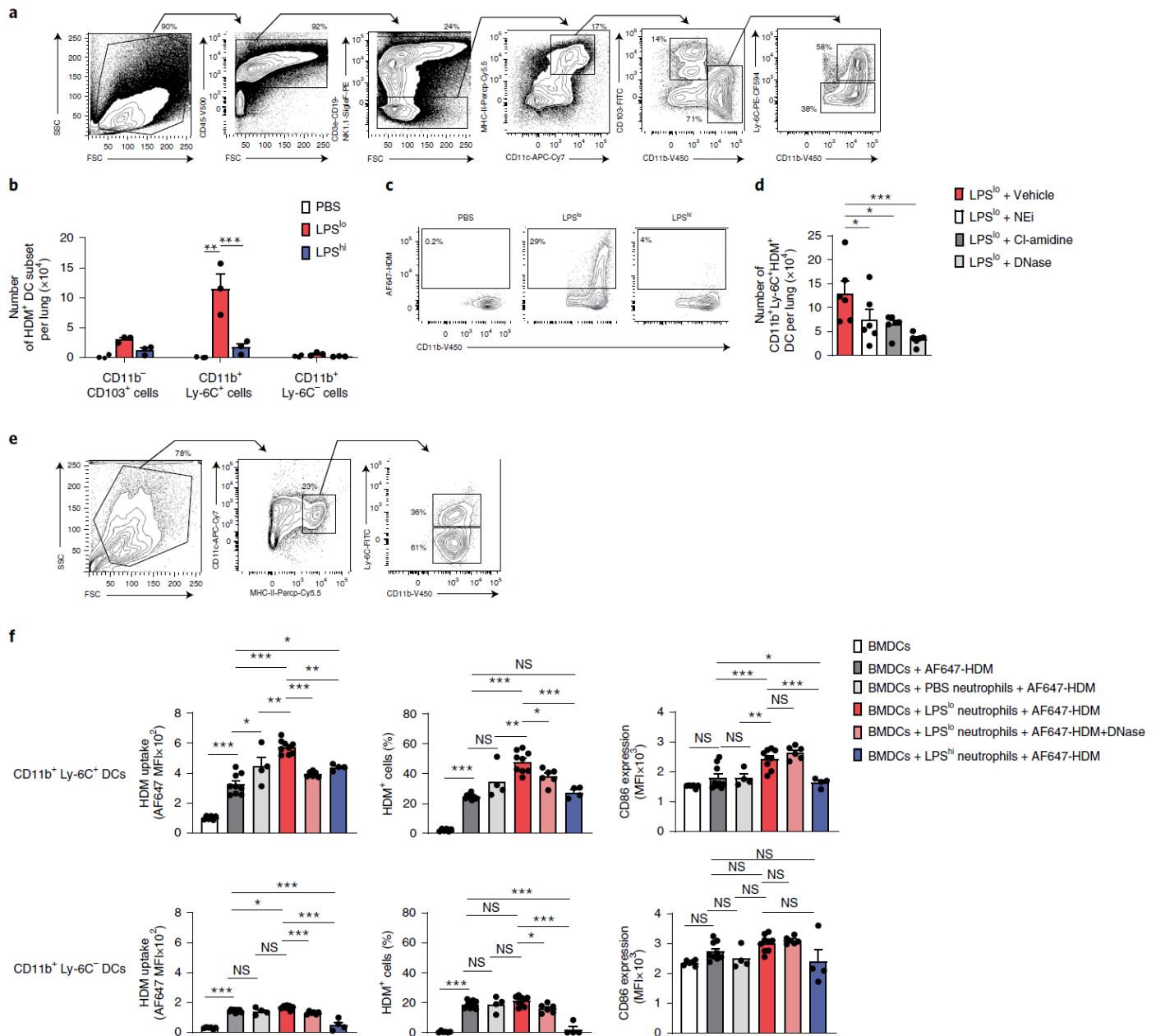


Fig. 6 | NETs released by LPS^o neutrophils directly promote HDM uptake by CD11b⁺Ly-6C⁺ DCs. **a**, Representative gating strategy delineating lung DC subsets in vehicle-AF647-HDM, LPS^o-AF647-HDM and LPS^{hi}-AF647-HDM mice, assessed 24 h after i.n. AF647-HDM. Lung cells from a LPS^o-AF647-HDM mouse is shown. DCs were defined as CD45⁺CD3e⁺CD19⁺NK1.1⁺SiglecF⁺MHC-II⁺CD11c⁺ cells and further divided into CD11b⁺CD103⁺, CD11b⁺Ly-6C⁺ and CD11b⁺Ly-6C⁻ DCs. **b**, Absolute numbers of lung AF647-HDM⁺ DC subsets in mice, as in **a**. **c**, Representative dot plots showing AF647-HDM MFI in lung CD11b⁺Ly-6C⁺ DCs from mice, as in **a**. **d**, Absolute numbers of lung CD11b⁺Ly-6C⁺AF647-HDM⁺ DCs, assessed 24 h after i.n. AF647-HDM in LPS^o-AF647-HDM mice treated i.p. with 3 daily injections of DNase, starting 1 d before LPS^o treatment, or treated with 5 i.p. injections of NEI or Cl-amidine, every 12 h starting 1 d before LPS^o treatment. **e**, Representative gating strategy delineating BMDC subsets. BMDCs were defined as MHC-II⁺CD11c⁺ cells and further divided into CD11b⁺Ly-6C⁻ and CD11b⁺Ly-6C⁺ subsets. **f**, MFI of AF647-HDM (left), percentage of AF647-HDM⁺ cells (middle), and CD86 expression (right) in CD11b⁺Ly-6C⁺ (top) and CD11b⁺Ly-6C⁻ (bottom) BMDCs, assessed 12 h after treatment with AF647-HDM and after co-culture with vehicle, LPS^o or LPS^{hi} neutrophils in the presence or absence of DNase. **b,d,f**, Data show mean \pm s.e.m. and are pooled from ≥ 3 independent experiments, each symbol representing independent experiments in which cells from 3–5 mice were pooled by group (**b,d**) ($n = 3,6$, respectively) or independent co-culture experiments (**f**) (BMDCs; BMDCs + AF647-HDM; BMDCs + PBS neutrophils + AF647-HDM; BMDCs + LPS^o neutrophils + AF647-HDM; BMDCs + LPS^o neutrophils + AF647-HDM + DNase; BMDCs + LPS^{hi} neutrophils + AF647-HDM: $n = 6;9;4;9;6;4$, respectively). *P* values were calculated with a two-way (**b**) or a one-way ANOVA with Tukey's post hoc test (**d,f**). **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001. NS, not significant.

of AF647-HDM-treated BMDCs with LPS^o neutrophils (Fig. 6f). AF647-HDM uptake, especially by CD11b⁺Ly-6C⁺ BMDCs, was significantly diminished when DNase was added to the co-culture of BMDCs with LPS^o neutrophils (Fig. 6f), indicating that the process was dependent on NETs. Co-culture of BMDCs with LPS^o neutrophils, but

not with vehicle or LPS^{hi} neutrophils, promoted the expression of the pro-T_H2 co-stimulatory molecule CD86 (refs. 34,35) on CD11b⁺Ly-6C⁺ BMDCs, and this effect was not affected by DNase treatment (Fig. 6f). Thus, LPS^o neutrophils acted on CD11b⁺Ly-6C⁺ DCs directly to promote AF647-HDM uptake through NET-dependent mechanisms.

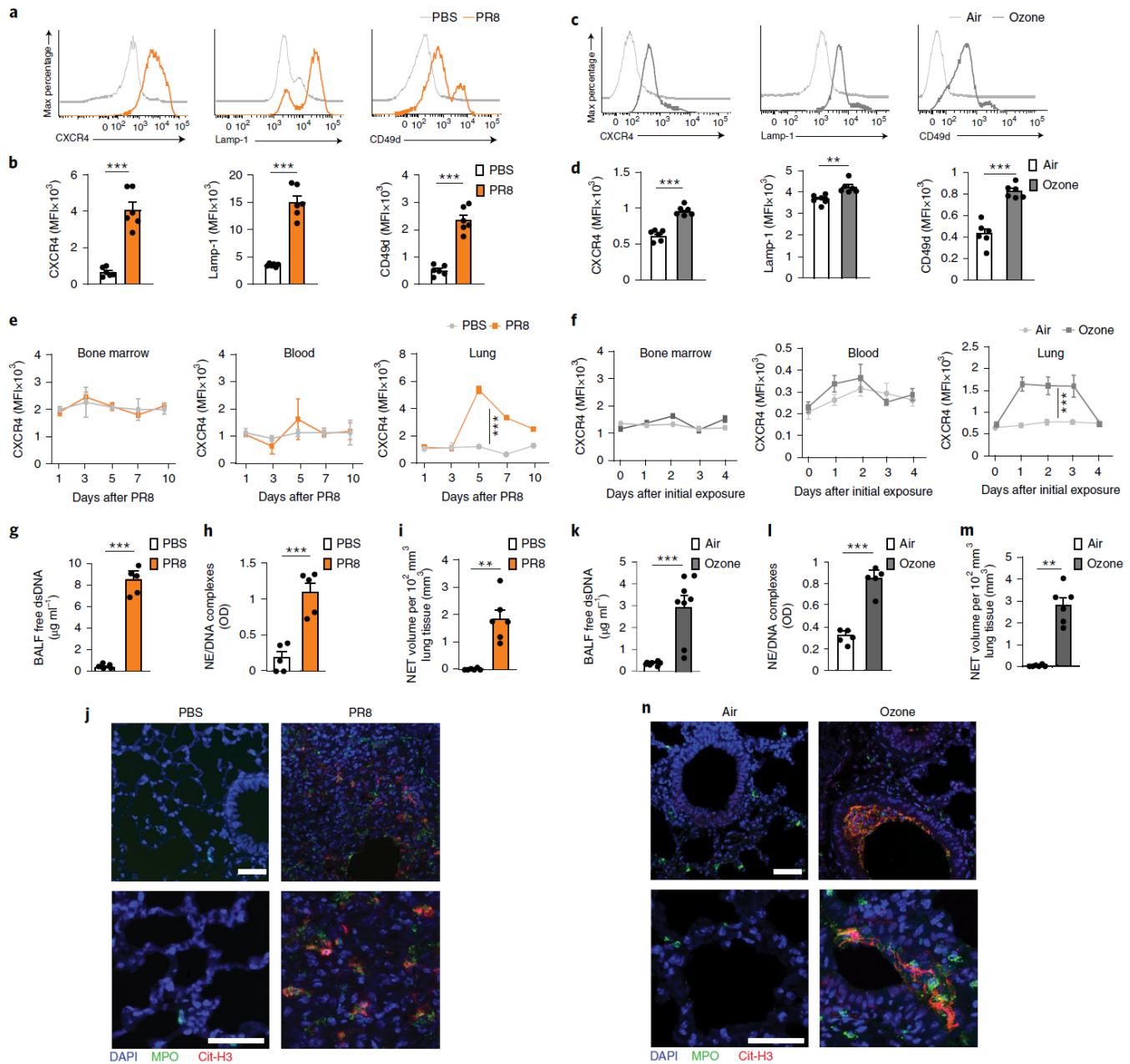


Fig. 7 | Influenza virus infection and ozone exposure instruct recruited lung CXCR4^{hi} neutrophils to release NETs. **a, c**, Representative histograms of CXCR4, Lamp-1 and CD49d expression by lung CD45⁺CD11b^{hi}Ly-6G^{hi} neutrophils 7 d after influenza virus (PR8) infection (**a**) or 24 h after 3 daily ozone exposures (**c**). **b, d**, MFI showing quantification of CXCR4, CD49d and Lamp-1 expression by lung CD45⁺CD11b^{hi}Ly-6G^{hi} neutrophils as in **a** and **c**, respectively. **e, f**, Kinetic analysis of CXCR4 expression by bone marrow, blood and lung CD45⁺CD11b^{hi}Ly-6G^{hi} neutrophils after PR8 infection (**e**) or ozone exposure (**f**), as in **a**. **g, k**, Levels of extracellular dsDNA in the BALF of PBS-injected and PR8-infected mice (**g**), 7 d after PR8, or air- and ozone-exposed mice, 24 h after 3 daily ozone exposures (**k**). **h, l**, ELISA measurement of NE-DNA complexes in the BALF of mice, as in **g** and **k**, respectively. **i, m**, Confocal microscopy stainings of Cit-H3⁺MPO⁺ NETs on lung sections of mice, as in **g** and **k**, respectively. Pictures are representative of one of >5 lungs analyzed. **j, n**, Quantification of NET volume in lung sections of mice, as in **g** and **k**, respectively. (**b, d, i, k, m**) Data show mean + s.e.m. and are pooled from 2–3 independent experiments (**b, d, g, h, i, k, l, m**) ($n = 6, 6, 5, 5, 6, 8, 5, 6$) mice per group, respectively) or 2 independent experiments per time point analyzed (**e, f**) ($n = 4$ mice per time point). P values were calculated using an unpaired two-tailed Student's t -test (**b, d, g, i, k, m**) or a one-way ANOVA that compares PR8-infected or ozone-exposed versus control counterparts (**e, f**). ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. NS, not significant; OD, optical density. Scale bars, 50 μ m.

Other pro-allergic factors promote allergic asthma via NETs. Next, we tested whether NET-prone CXCR4^{hi} neutrophils were associated with additional pro-allergic conditions. Besides low exposure to microbial products, respiratory viral infections⁶ and air pollution⁷ also represent risk factors for allergic asthma in humans.

In mice, acute respiratory infection with influenza virus³⁶ or exposure to ozone³⁷ promote allergic airway inflammation to HDM or ovalbumin, respectively. BALB/c mice infected i.n. with 5 plaque-forming units (PFU) of influenza A virus H1N1 strain PR8/34 (PR8) had decreased body weight at day 7 (Supplementary Fig. 7a,b) and

ARTICLES

NATURE IMMUNOLOGY

increased lung viral RNA expression (Supplementary Fig. 7c) and numbers of CD45⁺CD11b^{hi}Ly-6G^{hi} neutrophils (Supplementary Fig. 7d) between 3 and 7 d after infection. Similarly, BALB/c mice exposed for 3 d to 2 ppm ozone during 3 h also had increased lung neutrophil numbers 24 h after the last exposure (Supplementary Fig. 7e,f). Seven days after PR8 or 24 h after ozone exposure, these neutrophils had increased expression of CXCR4, Lamp-1 and CD49d as compared to neutrophils from uninfected or air-exposed control mice (Fig. 7a–d), suggesting shared phenotypical similarities with LPS^{lo} neutrophils. In addition, CXCR4^{hi} neutrophils were only found in the lung and could not be detected in the blood or BM (Fig. 7e,f), suggesting local imprinting. NETs were also found in the lungs of mice infected with PR8 or exposed to ozone (Fig. 7g–n and Supplementary Fig. 7g–k), suggesting that exposure to other pro-allergic factors triggered the accumulation of NET-prone CXCR4^{hi} neutrophils in the lungs.

Next, we instilled PR8-infected mice i.n. with 40 µg of HDM 7 d after PR8 and with 10 µg of HDM 7 d later (PR8-HDM). To test the contribution of NETs to PR8-triggered allergic asthma, PR8-HDM mice were treated daily for 12 d with DNase i.p., starting 5 d after PR8. Alternatively, PR8-HDM mice were treated every 12 h with NEi or Cl-amidine i.p. for the same duration as for DNase. Three days after the HDM challenge, we observed increased susceptibility of PR8-HDM mice to develop airway eosinophilia and HDM-specific IgG1 (Fig. 8a), HDM-specific type 2 immunity (Fig. 8b) and goblet cell hyperplasia (Fig. 8c,d), while administration of HDM without pre-exposure to PR8 did not induce features of allergic asthma and treatments of PR8-HDM mice with DNase, NEi and Cl-amidine resulted in a significant decrease of nearly all features of allergic asthma compared to vehicle PR8-HDM mice, except for LN production of IL-13, which was similar in DNase-treated and vehicle PR8-HDM mice (Fig. 8b). In addition, while we observed higher numbers of lung CD11b⁺Ly-6C⁺AF647-HDM⁺ DCs in PR8-AF647-HDM mice than in uninfected AF647-HDM-treated controls 24 h after AF647-HDM, these numbers were significantly decreased in DNase-, NEi- and Cl-amidine-treated PR8-AF647-HDM mice compared to vehicle PR8-AF647-HDM controls (Fig. 8e).

We also instilled ozone-exposed mice i.n. with 40 µg of HDM 1 d after the last ozone treatment and with 10 µg of HDM 7 d later (ozone-HDM). Some ozone-HDM mice were also treated daily for 4 d with DNase i.p., starting the first day of ozone exposure. Alternatively, ozone-HDM mice were treated every 12 h with NEi or Cl-amidine i.p. for the same duration as for DNase. Three days after the HDM challenge, we observed increased susceptibility of ozone-HDM mice to develop airway eosinophilia and HDM-specific IgG1 (Fig. 8f), HDM-specific type 2 immunity (Fig. 8g), goblet cell hyperplasia (Fig. 8h,i) and peribronchial inflammation (Supplementary Fig. 8), while administration of HDM without pre-exposure to ozone did not induce features of allergic asthma and treatments of ozone-HDM mice with DNase, NEi and Cl-amidine resulted in a significant decrease of all the features of allergic asthma tested (Fig. 8f–i and Supplementary Fig. 8). In addition, while we observed higher numbers of lung CD11b⁺Ly-6C⁺AF647-HDM⁺ DCs in ozone-AF647-HDM mice than in air-exposed AF647-HDM-treated controls 24 h after AF647-HDM, these numbers were significantly decreased in DNase-, NEi- and Cl-amidine-treated ozone-AF647-HDM mice compared to vehicle ozone-AF647-HDM controls (Fig. 8j).

These observations suggested that NETs promoted AF647-HDM uptake by lung CD11b⁺Ly-6C⁺ DCs and mediated allergic airway inflammation triggered by flu infection or ozone exposure.

Discussion

Here we showed that neutrophils have an important role in type 2 allergic immunity and link pro-allergic environmental conditions and host allergic susceptibility. We showed that airway exposure to low-dose LPS, influenza virus infection and ozone exposure in mice

induced the accumulation of NET-releasing CXCR4^{hi} neutrophils in the lung. These neutrophils promoted the uptake of HDM by lung CD11b⁺Ly-6C⁺ DCs and increased susceptibility to allergic asthma.

LPS measurements have been used in epidemiological studies related to the ‘hygiene hypothesis’, suggesting that an LPS-rich environment is associated with reduced risk of atopy and asthma, while LPS-poor environments represent a risk factor for the development of asthma^{8,38}. The ‘hygienic’ model used here is an adaptation of a previous model²¹, in which priming with a low or high dose of LPS biased the immune response to ovalbumin towards a T_H2 or T_H1 profile, respectively. Here, we found that exposure to a low dose of LPS in BALB/c mice potentiated HDM-induced type 2 allergic asthma, while priming with a higher dose of LPS²² had no substantial effect.

Airway exposure to low-dose LPS in mice triggered NET-releasing CXCR4^{hi} neutrophils in the lung. These neutrophils shared similarities with ‘aged’ neutrophils, a subset of NET-prone CXCR4^{hi} neutrophils found in the blood^{25,26}. Kinetic analyses of CXCR4 expression on lung, blood and BM neutrophils indicated that neutrophils were recruited to the lung and instructed locally. This indicates that CXCR4^{hi} neutrophils, rather than representing a subset, are in a transient state of activation that depends on a local stimulus (that is, low-dose LPS). Our data argue in favor of the notion that neutrophils are heterogeneous, plastic and adaptable to context-specific cues to exert particular functions¹⁴. We found that these locally instructed CXCR4^{hi} neutrophils represented early and critical players in the initiation of type 2 allergic asthma against HDM allergens. Given the central role of epithelial-derived alarmins, including IL-33, IL-25 and TSLP in the initiation of type 2 allergic immunity³⁹, it would be interesting to test their respective contributions to the imprinting of CXCR4^{hi} neutrophils.

We used DNase, NEi and Cl-amidine to assess the functional importance of NETs in the initiation of allergic asthma. None of these approaches are fully specific for NETs³⁶. Cl-amidine inhibits the activity of PAD4, which is implicated in chromatin reorganization and is expressed in many cell types. Treatment with Cl-amidine may lead to decreased activity of citrullinated histone proteins rather than NET impairment¹⁹. In addition, the biological activity of the inhibitors may not be optimal in the tissue and could be influenced by factors that are inherent to the experimental models used. However, treatment with DNase, NEi and Cl-amidine impaired NETs and had the same global outcome on the development of HDM-induced asthma, suggesting that NETs could be mediating the onset of allergic airway inflammation to HDM in the models tested here.

Low-dose LPS, influenza virus infection and ozone exposure were associated with an increased uptake of fluorescent-labeled HDM by CD11b⁺Ly-6C⁺ DCs, an important step in the initiation of HDM-specific type 2 responses^{31,32}. Allergen uptake was significantly reduced in NET-targeted mice, supporting the idea that NETs can directly or indirectly modulate this process. Ex vivo co-culture experiments with lung neutrophils and BMDCs further indicated that NETs derived from LPS^{lo} neutrophils could directly promote HDM uptake by CD11b⁺Ly-6C⁺ DCs. Our study is in accordance with reports that extracellular host DNA, the main NET component, is a potent signal that promotes the activation of DCs and type 2 immune responses^{20,40}.

Whether CXCR4^{hi} neutrophils and NETs can trigger type 2 sensitization against other type 2-inducing stimuli, such as fungal proteases, food allergens, helminths or additional pro-allergic factors (such as other respiratory viruses, exhaust particles, cigarette smoke) in BALB/c or other genetic backgrounds remains unclear¹⁷. In humans, neutrophils are important immune-modulating cells in the effector phase of severe asthma, which is characterized by neutrophilic inflammation, high expression of IL-17 and resistance to corticosteroids^{16–19}. Whether particular NET-releasing neutrophils contribute to the initiation of type 2 allergic asthma in humans remains unknown. A prospective Danish study found that the

NATURE IMMUNOLOGY

ARTICLES

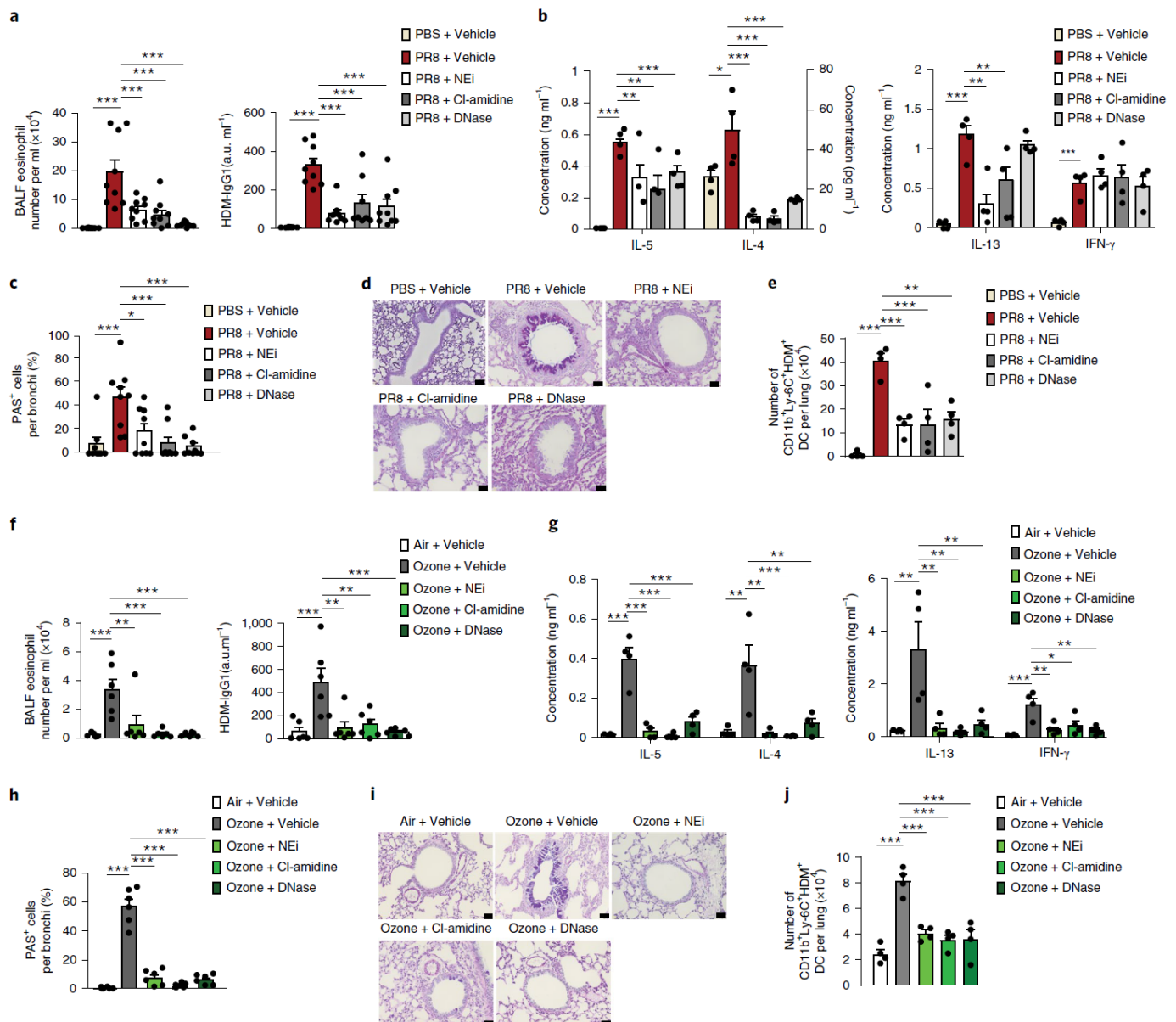


Fig. 8 | NETs mediate influenza virus- and ozone-potentiated type 2 allergic airway inflammation to HDM. **a**, Eosinophil cell counts in the BALF (left) and ELISA measurement of HDM-specific IgG1 in the serum (right), assessed 3 d after the second HDM administration in vehicle-HDM and PR8-HDM mice treated daily for 12 d with DNase i.p., starting 5 d after PR8, or treated every 12 h with NEi or Cl-amidine i.p., for the same duration as for DNase. **b**, ELISA measurement of cytokine production by HDM-restimulated BLN cells of mice, as in **a**. **c**, Quantification of PAS-stained epithelial cells per bronchi showing airway mucus production in mice, as in **a**. **d**, Representative PAS staining of lung sections of mice, as in **a**. **e**, Absolute numbers of lung CD11b $^+$ Ly-6C $^+$ AF647-HDM $^+$ DCs assessed 8 d after PR8 and 24 h after AF647-HDM in vehicle-AF647-HDM and PR8-AF647-HDM mice treated daily for 3 d with DNase i.p., starting 5 d after PR8, or treated every 12 h with NEi or Cl-amidine i.p., for the same duration as for DNase. **f**, Eosinophil cell counts in the BALF (left) and ELISA measurement of HDM-specific IgG1 in the serum (right), assessed 3 d after the second HDM administration in vehicle-HDM and ozone-HDM mice treated daily for 4 d with DNase i.p., starting the first day of ozone exposure, or treated every 12 h with NEi or Cl-amidine i.p., for the same duration as for DNase. **g**, ELISA measurement of cytokine production by HDM-restimulated BLN cells of mice as in **f**. **h**, Quantification of PAS-stained epithelial cells per bronchi showing airway mucus production in mice, as in **f**. **i**, Representative PAS staining of lung sections of mice, as in **f**. **j**, Absolute numbers of lung CD11b $^+$ Ly-6C $^+$ AF647-HDM $^+$ DCs assessed 2 d after the last ozone exposure and 24 h after AF647-HDM in mice, as in **f**. **a–c, e, f, h, j** Data show mean \pm s.e.m. and are pooled from 2–3 independent experiments, each symbol representing individual mice (**a, c, f, h**) ($n = 9, 9, 6, 6$ mice per group, respectively) or independent experiments in which cells from 2–4 mice were pooled by group (**b, e, g, j**). P values were calculated with a one-way ANOVA with Tukey's post hoc test. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. a.u., arbitrary unit. Scale bar, 32 μ m.

number of respiratory infections in early life, but not the particular viral trigger, was associated with asthma development⁴¹. The authors postulated that a host-derived factor might underlie the increased allergic susceptibility⁴¹. Our results suggest that the accumulation of NET-prone neutrophils could be such a host-associated factor. In

addition, blood neutrophils from Hutterite children, who are raised in an environment poor in LPS and are prone to develop allergies, have higher expression of CXCR4 than blood neutrophils from Amish children, who live in LPS-rich homes and are protected from allergies³⁸. While lung neutrophils have not been assessed in these

ARTICLES

NATURE IMMUNOLOGY

children, it is tempting to speculate that environmental risk factors may promote allergic airway sensitization in humans by inducing NET-prone CXCR4^{hi} neutrophils, which increase host susceptibility to mount type 2 allergic responses towards aeroallergens.

Online content

Any methods, additional references, Nature Research reporting summaries, source data, statements of code and data availability and associated accession codes are available at <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0496-9>.

Received: 4 June 2018; Accepted: 15 August 2019;

Published online: 07 October 2019

References

- Braman, S. S. The global burden of asthma. *Chest* 130, 4s–12s (2006).
- Galli, S. J., Tsai, M. & Piliponsky, A. M. The development of allergic inflammation. *Nature* 454, 445–454 (2008).
- Vercelli, D. Discovering susceptibility genes for asthma and allergy. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 169–182 (2008).
- Eder, W., Ege, M. J. & von Mutius, E. The asthma epidemic. *N. Engl. J. Med.* 355, 2226–2235 (2006).
- Platts-Mills, T. A. The allergy epidemics: 1870–2010. *J. Allergy Clin. Immunol.* 136, 3–13 (2015).
- Busse, W. W., Lemanske, R. F. Jr. & Gern, J. E. Role of viral respiratory infections in asthma and asthma exacerbations. *Lancet* 376, 826–834 (2010).
- Peden, D. B. The epidemiology and genetics of asthma risk associated with air pollution. *J. Allergy Clin. Immunol.* 115, 213–219 (2005). quiz 220.
- Braun-Fahrlander, C. et al. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N. Engl. J. Med.* 347, 869–877 (2002).
- Strachan, D. P. Family size, infection and atopy: the first decade of the 'hygiene hypothesis'. *Thorax* 55, S2–S10 (2000).
- Lloyd, C. M. & Snelgrove, R. J. Type 2 immunity: expanding our view. *Sci. Immunol.* 3, eaat1604 (2018).
- Lambrecht, B. N. & Hammad, H. The immunology of asthma. *Nat. Immunol.* 16, 45–56 (2015).
- Gregory, L. G. & Lloyd, C. M. Orchestrating house dust mite-associated allergy in the lung. *Trends Immunol.* 32, 402–411 (2011).
- Locksley, R. M. Asthma and allergic inflammation. *Cell* 140, 777–783 (2010).
- Ng, L. G., Ostuni, R. & Hidalgo, A. Heterogeneity of neutrophils. *Nat. Rev. Immunol.* 19, 255–265 (2019).
- Papayannopoulos, V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 18, 134–147 (2018).
- Krishnamoorthy, N. et al. Neutrophil cytoplasts induce TH17 differentiation and skew inflammation toward neutrophilia in severe asthma. *Sci. Immunol.* 3, eaao4747 (2018).
- Radermecker, C., Louis, R., Bureau, F. & Marichal, T. Role of neutrophils in allergic asthma. *Curr. Opin. Immunol.* 54, 28–34 (2018).
- Wang, Y. H. & Wills-Karp, M. The potential role of interleukin-17 in severe asthma. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 11, 388–394 (2011).
- Lachowicz-Scroggins, M. E. et al. Extracellular DNA, neutrophil extracellular traps, and inflammasome activation in severe asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 199, 1076–1085 (2019).
- Toussaint, M. et al. Host DNA released by NETosis promotes rhinovirus-induced type-2 allergic asthma exacerbation. *Nat. Med.* 23, 681–691 (2017).
- Eisenbarth, S. C. et al. Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *J. Exp. Med.* 196, 1645–1651 (2002).
- Schuijs, M. J. et al. Farm dust and endotoxin protect against allergy through A20 induction in lung epithelial cells. *Science* 349, 1106–1110 (2015).
- Zheng, G. X. et al. Massively parallel digital transcriptional profiling of single cells. *Nat. Commun.* 8, 14049 (2017).
- Remijns, Q. et al. Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. *Cell Res.* 21, 290–304 (2011).
- Adrover, J. M., Nicolas-Avila, J. A. & Hidalgo, A. Aging: a temporal dimension for neutrophils. *Trends Immunol.* 37, 334–345 (2016).
- Casanova-Acebes, M. et al. Rhythmic modulation of the hematopoietic niche through neutrophil clearance. *Cell* 153, 1025–1035 (2013).
- Dwyer, M. P. et al. Discovery of 2-hydroxy-N,N-dimethyl-3-[2-[(R)-1-(5-methylfuran-2-yl)propyl]amino]-3,4-dioxocyclobut-1-enylamino] benzamide (SCH527123): a potent, orally bioavailable CXCR2/CXCR1 receptor antagonist. *J. Med. Chem.* 49, 7603–7606 (2006).
- Reuthershan, J. et al. Critical role of endothelial CXCR2 in LPS-induced neutrophil migration into the lung. *J. Clin. Invest.* 116, 695–702 (2006).
- Cools-Lartigue, J. et al. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. *J. Clin. Invest.* 123, 3446–3458 (2013).
- Wang, Y. et al. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J. Cell Biol.* 184, 205–213 (2009).
- Mesnil, C. et al. Resident CD11b⁺Ly6C⁺ lung dendritic cells are responsible for allergic airway sensitization to house dust mite in mice. *PLoS ONE* 7, e53242 (2012).
- Plantinga, M. et al. Conventional and monocyte-derived CD11b⁺ dendritic cells initiate and maintain T helper 2 cell-mediated immunity to house dust mite allergen. *Immunity* 38, 322–335 (2013).
- Marichal, T. et al. Interferon response factor 3 is essential for house dust mite-induced airway allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 126, 836–844.e13 (2010).
- Larché, M. et al. Costimulation through CD86 is involved in airway antigen-presenting cell and T cell responses to allergen in atopic asthmatics. *J. Immunol.* 161, 6375–6382 (1998).
- Janss, T. et al. Interferon response factor-3 promotes the pro-Th2 activity of mouse lung CD11b⁺ conventional dendritic cells in response to house dust mite allergens. *Eur. J. Immunol.* 46, 2614–2628 (2016).
- Al-Garawi, A. A. et al. Acute, but not resolved, influenza A infection enhances susceptibility to house dust mite-induced allergic disease. *J. Immunol.* 182, 3095–3104 (2009).
- Hollingsworth, J. W. et al. Ozone activates pulmonary dendritic cells and promotes allergic sensitization through a Toll-like receptor 4-dependent mechanism. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, 1167–1170 (2010).
- Stein, M. M. et al. Innate immunity and asthma risk in amish and hutterite farm children. *N. Engl. J. Med.* 375, 411–421 (2016).
- Roan, E., Obata-Ninomiya, K. & Ziegler, S. F. Epithelial cell-derived cytokines: more than just signaling the alarm. *J. Clin. Invest.* 129, 1441–1451 (2019).
- Marichal, T. et al. DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity. *Nat. Med.* 17, 996–1002 (2011).
- Bonnelykke, K., Vissing, N. H., Sevelsted, A., Johnston, S. L. & Bisgaard, H. Association between respiratory infections in early life and later asthma is independent of virus type. *J. Allergy Clin. Immunol.* 136, 81–86.e4 (2015).

Acknowledgments

We thank F. Trottein (Pasteur Institute, Lille, France) for providing us with the Influenza A virus H1N1 PR8/34 strain; S. Ormenese, R. Stefan, J.-J. Goyal and A. Hego from the GIGA Flow Cytometry and Cell Imaging Platform; P. Drion and all staff members from the GIGA Mouse facility and Transgenics Platform; C. Humblet and staff members from the GIGA Immunohistology Platform; B. Charlotiaux, M. Deckers, L. Karim and members from the GIGA Genomics Platform; C. Desmet and D. Pirotin for insightful discussions; and C. François, R. Fares and I. Sbaj for their excellent technical and administrative support. C. Radermecker and C.S. were research fellows of the F.R.S.-FNRS; S.L.J. was supported by a Chair from Asthma UK (no. CH11SJ, to S.L.J.) and Medical Research Council Center grant (no. G1000758, to S.L.J.); F.B. is supported by the F.R.S.-FNRS for the FRFS-WELBIO (grant no. CR-2012S-01R to F.B.) and by an Excellence Of Science (EOS) grant. T.M. is a Research Associate of the F.R.S.-FNRS and is supported by an 'Incentive Grant for Scientific Research' of the F.R.S.-FNRS (grant no. F4508.18 to T.M.), by the FRFS-WELBIO (grant no. CR-2017s-04 to T.M.), by the Acteria Foundation and by an ERC Starting Grant (grant no. ERC-StG-2018 IM-ID 801823 to T.M.).

Author contributions

C. Radermecker, T.M. and F.B. conceived the project. T.M., F.B., M.T., C. Radermecker and C.S. were involved in experimental design. C. Radermecker and C.S. realized most experiments, compiled the data and contributed equally to this work. P.M., C. Ruscitti and J.S. were involved in (bone marrow-derived) dendritic cell-related experiments. M.T. and S.L.J. were involved in experiments aiming at detecting and inhibiting NETs. C.V., F.P., N.R. and D.C. contributed to experiments involving ozone exposure and invasive measurements of airway function. T.M. analyzed scRNA-seq data with the help of the GIGA Genomics Platform. C. Radermecker and T.M. prepared the figures, and T.M. wrote the manuscript. All authors provided feedback on the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0496-9>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to F.B. or T.M.

Peer review information Ioana Visan was the primary editor on this article and managed its editorial process and peer review in collaboration with the rest of the editorial team.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature America, Inc. 2019

NATURE IMMUNOLOGY

ARTICLES

Methods

Mice. Female BALB/c mice were purchased from Janvier Laboratories. Age-matched, 6- to 10-week-old mice were used for experiments. Mice were housed under specific pathogen-free conditions and maintained in a 12-h light–dark cycle with food and water ad libitum. All animal experiments described in this study were reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Liège. The 'Guide for the Care and Use of Laboratory Animals', prepared by the Institute of Laboratory Animal Resources, National Research Council, and published by the National Academy Press, as well as European and local legislations, were followed carefully.

Reagents and antibodies. 2.4G2 Fc receptor-blocking antibodies were produced in house. Anti-mouse FITC- and V500-conjugated anti-CD45.2 (clone 104), PE-conjugated anti-CD3 (clone 142-2C11), PE-conjugated anti-CD19 (clone 1D3), PE-conjugated anti-NK1.1 (clone pk136), PE-conjugated anti-SiglecF (clone E50-2440), PE-conjugated anti-Ly-6G (clone RB6-8C5), eFluor450- and PE-Cy7-conjugated anti-CD11b (clone M1/70), PE-Cy7-conjugated anti-Ly-6G (clone 1A8), APC-Cy7-conjugated anti-CD11c (clone HL3), PE-CF594-conjugated anti-Ly-6C (clone 49-44), FITC-conjugated anti-CD103 (clone M290), PE-conjugated anti-Lamp-1 (CD107a) (clone 1D4B) and PE-conjugated streptavidin antibodies were purchased from BD Biosciences. Anti-mouse PE-conjugated anti-CXCR4 (clone 2B11), anti-mouse PE-conjugated anti-CD49d (clone R1-2) and anti-mouse anti-CD86 biotin (clone GL-1) antibodies were purchased from eBioscience. Anti-mouse PerCP-Cy5.5-conjugated anti-MHC-II (Ia-Ie) (clone M5/M4,15,2) and BV421-conjugated anti-CD64 (clone X54-5/7.1) antibodies were purchased from Biolegend.

Unconjugated goat anti-mouse MPO (catalog no. AF3667) antibodies were purchased from R&D systems; unconjugated rabbit anti-mouse anti-citrullinated H3 (catalog no. Ab5103) antibodies were purchased from Abcam. Donkey anti-rabbit and anti-goat IgG antibodies conjugated with AlexaFluor568 and AlexaFluor488, respectively, were purchased from ThermoFisher.

Anti-mouse HSP90 α , goat anti-rabbit immunoglobulins/HRP and rabbit anti-mouse immunoglobulins/HRP were purchased from Agilent.

Additional reagents can be found in the sections below.

Model of low-dose-LPS-triggered allergic asthma to HDM. Isoflurane-anesthetized BALB/c wild-type mice were instilled i.n. with different doses of LPS ranging from 0.1 ng to 10 μ g, two of which were chosen as low (100 ng) or high (10 μ g) doses (LPS from *Escherichia coli* O55:B5, Sigma-Aldrich). Vehicle mice were instilled i.n. with 50 μ l of PBS. One day later (day 1), mice were administered i.n. with 40 μ g of HDM (HDM *pterysinus*, Greer Laboratories) in 50 μ l of PBS. Seven days later (day 8), all mice were challenged by i.n. instillation of 10 μ g of HDM in 50 μ l of PBS. Three days after the HDM challenge (day 11), we estimated bronchial hyperresponsiveness to methacholine by assessing dynamic airway resistance in anesthetized animals subjected to increased doses of methacholine with a FlexiVent small animal ventilator (SCIREQ) system⁴². Animals were then euthanized, and features of allergic airway inflammation were assessed. BALF cytology and lung histology were performed as described⁴². The extent of perivascular and peribronchial inflammation was estimated by a score calculated by means of quantification of inflammatory cells in lung sections stained with hematoxylin and eosin³⁹. Briefly, score 0 was assigned to bronchi with no surrounding leukocyte infiltration; score 1 corresponded to few infiltrating leukocytes; scores 2 or 3 were assigned if there were from 1 to 2 or 3 to 5 layer(s) of perivascular and/or peribronchial leukocytes, respectively. Mucus production was quantified as the percentage of Periodic acid–Schiff (PAS)-stained goblet cells per total epithelial cells in randomly selected bronchi. Bronchial lymph node (BLN) cells were collected, pooled from 2–5 mice (Figs. 1c, 4j, 5d and 8b,g) and cultured in complete RPMI medium with or without HDM restimulation (30 μ g ml⁻¹). Culture supernatants were assessed for cytokine production (IL-4, IL-5, IL-13, IFN- γ) by ELISA (eBiosciences).

Cell isolation, staining and flow cytometry. To obtain single-lung-cell suspensions, lungs were perfused with 10 ml of PBS through the right ventricle, cut into small pieces and digested for 1 h at 37°C in HBSS containing 1 mg ml⁻¹ collagenase A (Roche) and 0.05 mg ml⁻¹ DNase I (Roche). Blood was collected in an EDTA-containing tube (100 mM), and red blood cells were lysed with red blood cell lysis buffer (eBioscience). BM cells were isolated by flushing femurs with PBS. Cells were filtered through a 70- μ m cell strainer to obtain single-cell suspensions.

Cell phenotyping and sorting were performed on a FACSCANTO II and a FACSAria III (BD Biosciences), respectively. Staining reactions were performed at 4°C with 2% v/v of Fc block (BD Pharmingen) to reduce nonspecific binding. Anti-mouse Lamp-1 intracellular staining was performed with the Foxp3/Transcription factor Staining Buffer Set from eBiosciences.

FSC-W and FSC-A discrimination was used to exclude doublet cells, and ViaProbe (7-AAD) cell viability solution (BD Biosciences) was used to discriminate between dead and living cells. BM, blood and lung neutrophils were identified as SSC^{hi}CD45⁺CD11b^{hi}Ly-6G^{hi} cells. Neutrophil mean fluorescence intensity (MFI) of specific markers was quantified with FlowJo. Results were analyzed with FlowJo (Tree Star).

For scRNA-seq, adoptive transfer and co-culture experiments, single-lung-cell suspensions were obtained from lungs of vehicle, LPS^{lo} and LPS^{hi} mice 24 h after treatment. Neutrophils were first enriched by negative selection with a MACS Neutrophil Isolation kit (Miltenyi Biotec) and then sorted as CD45⁺ cells with nozzle 100 at 3,000 events s⁻¹ (see Supplementary Fig. 2b,c). Trypan blue-treated cells were examined under the microscope for counting and viability testing. Viability was above 95% for all three samples. Cell preparations were centrifuged at 300g for 5 min. For scRNA-seq, neutrophils were isolated from lung single-cell suspensions pooled from 3 BALB/c female wild-type mice per condition and were resuspended in calcium- and magnesium-free PBS containing 400 μ g ml⁻¹ bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich).

For cytologic examination and immunofluorescence ex vivo, CD45⁺CD11b^{hi}Ly-6G^{hi}CD49d^{lo} neutrophils from vehicle and LPS^{hi} mice and CD45⁺CD11b^{hi}Ly-6G^{hi}CD49d^{hi} neutrophils from LPS^{lo} mice were FACS sorted 24 h after LPS.

ScRNA-seq: library construction with 10x Genomics platform. Cellular suspensions were loaded on the Chromium Controller (10x Genomics, Pleasanton) to generate Gel Bead-In-Emulsions (GEMs). Barcoded sequencing libraries were generated with the Chromium Single Cell 3' Reagent Kits v2 (10x Genomics) following manufacturer's instructions. Sequencing libraries were loaded at 1.4 pM on an Illumina NextSeq500 with NextSeq 500/550 Mid Output v2 kit (150 cycles) (Illumina) with the following read lengths: 26 base pairs (bp) for Read 1 (16-bp Barcode + 10-bp Randomer), 8 bp for Sample Index and 58 bp for Read 2.

Analysis scRNA-seq samples. Cell Ranger software (v.1.2.0) (10x Genomics) was used to demultiplex Illumina BCL files to FASTQ files (cellranger mkfastq), to perform alignment (to mouse GRCh38/mm10 genome), filtering, UMI counting and to produce gene–barcode matrices (cellranger count).

Subsequent analysis used R bioconductor⁴³ (v.3.4.2.) and the R package Seurat⁴⁴ (v.2.1.0). We first performed a quality-control analysis and selected cells for further analysis (see Supplementary Fig. 2d,e). Gene counts were normalized, and highly variable genes were calculated. Cell–cell variation in the number of detected UMI was regressed out with the ScaleData function. Linear dimensional reduction was performed on the scaled data with the 'RunPCA' function. To identify the number of statistically significant principal components (PCs) to include for subsequent analyses, we used the 'JackStraw' function, which implements a resampling test inspired by the jackStraw procedure⁴⁴. PCs 1:11 were used in the subsequent analyses. We have also performed analyses including lower and higher numbers of PCs (1:8 to 1:13) and did not find any substantial change in the results obtained. Cells were clustered via the 'FindClusters' function. Several cluster resolutions were tested, and the resolution of 0.25 was chosen, because higher resolutions created additional subdivisions or clusters containing singlets, which were considered not relevant. To visualize the data, nonlinear dimensional reduction was used, and tSNE plots were created by use of the 'RunTSNE' function, with the number of dimensions to use set to 11 (PCs 1:11). The aforementioned analyses were performed on the individual Seurat objects (encompassing data from vehicle, LPS^{lo} and LPS^{hi} mice) but also on a merged Seurat object that encompassed merged data from vehicle, LPS^{lo} and LPS^{hi} mice. Differential expression (DE) analysis between clusters was performed with the 'FindMarkers' function. A value of 0.25 was attributed to the min.pct argument, which requires a gene to be detected at least in 25% in either of the two groups of cells. Only DE genes with an adjusted *P* value < 10⁻³ were retained. To define the transcriptomic signature of steady-state neutrophils (cluster 0) (see Supplementary Fig. 3c,d), lists of the significantly upregulated genes in cluster 0 compared to cluster 1 (that is, LPS^{lo}-induced), cluster 0 compared to clusters 2, 3 and 5 (that is, LPS^{hi}-induced), and cluster 0 compared to cluster 4 were generated, and genes commonly found in each of the 3 lists were retained. To define the common 'LPS signature' (see Supplementary Fig. 3e,f), lists of the significantly upregulated genes in cluster 1 compared to cluster 0, clusters 2, 3 and 5 compared to 0, and cluster 4 compared to cluster 0 were generated, and genes commonly found in each of the 3 lists were retained. To define cluster-specific gene signatures, only genes that did not belong to the common LPS signature and that were significantly upregulated in that specific cluster as compared to each of the others were retained. Statistical enrichment tests for Gene Ontology (GO) biological processes were performed with PANTHER 13.1 using a specific gene set for each cluster with a *P* value < 10⁻³ and minimal detection in 25% of cells with all genes contained in GO's *Mus musculus* database as reference.

Neutrophil cytologic examination. Cytologic examination of FACS-sorted neutrophils was performed on cytospin preparations stained with Hemacolor (Merck KgaA). Sections were examined with a FSX100 microscope (Olympus). Quantifications of neutrophil size and cytoplasm/nucleus ratio were performed with the ImageJ software.

Immunofluorescence. To assess the ability of neutrophils to form NETs ex vivo, 2.5 \times 10⁵ FACS-sorted neutrophils were seeded and cultured ex vivo on slides (Nunc Lab-Tek II Chamber Slide system, Sigma) precoated with poly-D-lysine hydrobromide (Sigma) for 24 h in supplemented D-MEM medium (Gibco). Supernatants were removed and chambers were rinsed with PBS. Slides were

ARTICLES

NATURE IMMUNOLOGY

then fixed with paraformaldehyde 10%, rinsed twice with PBS and permeabilized in PBS 0.5% triton X-100. Slides were then blocked and stained as described below.

To identify NETs from lung tissues, lungs were collected without performing BALF and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS. Lung tissues were paraffin-embedded, and lung sections were cut (2- μ m-thick sections) for immunofluorescence staining. After deparaffinization and rehydration, tissue sections were boiled for 20 min in 10-mM sodium carbonate buffer for antigen retrieval. Lung sections were permeabilized in PBS 0.5% triton X-100.

Samples were incubated with a blocking buffer (PBS with 2% BSA and 2% of donkey serum (Sigma-Aldrich)) for 1 h at room temperature (RT) and stained in blocking buffer with rabbit anti-mouse antibodies directed against citrullinated histone H3 (1:100 in blocking buffer) and with goat anti-mouse antibodies directed against MPO (1:40 in blocking buffer) during 1 h at RT. After washing samples with PBS, secondary donkey anti-rabbit IgG antibodies conjugated with AlexaFluor568 (1:200 in blocking buffer) and donkey anti-goat IgG antibodies conjugated with AlexaFluor488 (1:200 in blocking buffer) were added in blocking buffer containing DAPI (1:1,000) and incubated for 2 h in the dark at RT. Finally, samples were mounted with 10 μ l of ProLong Antifade reagent (ThermoFisher) on glass slides and stored at RT in the dark overnight.

All samples were analyzed by fluorescence microscopy with standard filter sets. Controls were stained with secondary antibody only, and nonspecific fluorescent staining was not detected when secondary antibodies were tested alone. Images were acquired on a Zeiss LSM 880 Airyscan Elyra S.1. confocal microscope (Zeiss) and processed with the ImageJ software. To quantify the volume of NETs released by neutrophils *ex vivo* (see Supplementary Fig. 4g) or present in the lung tissue (see Figs. 3j,k, 5a,b and 7i,m and Supplementary Figs. 5g, 6b and 7j), Z stack pictures were acquired and Imaris software was used. Briefly, we performed a three-dimensional reconstruction of structures staining double positive for H3-Cit (red) and MPO (green), and Imaris provided quantification of the volume of these structures, expressed as mm^3 per 10^2 neutrophils for *ex vivo* experiments (counted under the bright-field microscope and staining positive for intracellular MPO associated with the granules) or per 10^2 mm^3 of lung tissue.

DsDNA measurement in BALF. DsDNA was measured in the acellular fraction of the BALF, which was obtained after a double centrifugation and supernatant collection. Levels of dsDNA were determined with Quant-IT PicoGreen dsDNA reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol.

Western blotting. Lung tissues were homogenized in RIPA buffer supplemented with a cocktail of protease inhibitors (Complete, Roche). An equivalent amount of protein per sample was resolved on a 4–20% gel (Mini-PROTEAN TGX Precast Gels, biorad) and electroblotted on Invitrolon PVDF membranes (Life Technologies). Membranes were blocked 1 h at RT in TBS-Tween 0.1% containing 5% of dry milk and incubated overnight at 4°C with primary antibody anti-citrullinated H3 (1:1,000 in 0.1% TBS-tween and 5% BSA). The membranes were then incubated 2 h at RT with appropriate HRP-associated secondary antibodies in TBS-tween 0.1% containing 5% BSA. Equal loading was confirmed by probing for HSP90 α .

Measurement of NE–DNA complexes in BALF. Nunc plates (ThermoFisher) were coated overnight with anti-neutrophil elastase antibodies (1:2,000, Abcam, ab21595) and washed 3 times with PBS-Tween 0.05%. Plates were blocked 1 h at RT with PBS-BSA 1% and washed 3 times. Samples were then loaded for 2 h at RT and plates were then washed 5 times. Mouse anti-dsDNA antibodies were added for 1 h at RT followed, after 5 washes, by incubation with biotinylated rat anti-mouse IgG polyclonal antibodies for 90 min at RT. After extensive washing, secondary streptavidin–HRP (BD pharmlingen, catalog no. 554066) was added for 30 min at RT, followed by 5 washes. The relative amount of NE–DNA complexes was revealed with TMB substrate solution (Sigma-Aldrich).

Antibody-mediated neutrophil *in vivo* depletion. Neutrophils were depleted by i.p. injection of 500 μ g of anti-Ly-6G antibody (InVivo Plus anti-mouse Ly-6G, clone 1A8, Biorad) intraperitoneally (i.p.) 1 d before (day –1), at day 0 and 1 d after LPS exposure (day 1) (see Supplementary Fig. 5a). Mice were killed 3 h later.

Inhibition of LPS-induced lung neutrophil recruitment. To inhibit LPS-induced lung neutrophil recruitment²⁸, an antagonist of the chemokine receptor CXCR2 (that is, SCH527123²⁷, MedChem Express) was given orally, by gavage, at the dose of 3 mg kg^{–1}, 2 h before, 4 h after and 8 h after LPS treatment, as well as 2 h before and 4 h after i.n. administration of 40 μ g of HDM. Seven days later, mice were challenged with 10 μ g of HDM, and features of allergic airway inflammation were assessed 3 d later.

Neutrophil adoptive transfers. After MACS enrichment and FACS sorting, neutrophils were resuspended in calcium- and magnesium-free PBS at the concentration of 2.10^7 cells/ml. Five hundred thousand (5×10^5) cells, together with 40 μ g of HDM, were injected intratracheally to naive mice in 50 μ l of PBS. Seven days later, mice were challenged with 10 μ g of HDM, and features of allergic airway inflammation were assessed 3 d later.

Degradation of NETs and inhibition of NET formation *in vivo*. The formation of NETs was prevented *in vivo* by i.p. injection of NEi (GW-311616 hydrochloride, Axon Medchem) (2.5 μ g g^{–1} in 200 μ l of PBS) or of Cl-amidine (10x stock solution in DMSO, Sanbio) (10 mg kg^{–1} in 200 μ l of 1% DMSO v/v in PBS), twice daily from day –1 to day +2 (LPS model) or from day 5 to day 17 (PR8 infection model), or from day 0 to day 3 (ozone model). Alternatively, NETs were degraded by injecting 1,000 IU DNase I (Sigma-Aldrich) i.p. in 200 μ l of HBSS once daily from day –1 to day +2 (model of LPS exposure) or from day 5 to day 17 (PR8 infection model) or from day 0 to day 3 (ozone model). In pilot experiments, we compared the responses of LPS^{lo}-HDM, PR8-HDM or ozone-HDM mice with their vehicle-treated counterparts (either HBSS, PBS or 1% DMSO v/v, used separately) and confirmed that vehicle did not affect the response. In subsequent experiments, vehicle LPS^{lo}-HDM, PR8-HDM or ozone-HDM mice were treated randomly with either HBSS, PBS or DMSO 1% v/v.

AF647-HDM uptake by lung DC subsets. To assess HDM uptake by lung DCs, LPS^{lo} or ozone-exposed mice were administered i.n. with 40 μ g of HDM labeled with Alexafluor-647 (AF647-HDM) (Alexa Fluor 647 Protein Labeling Kit, ThermoFisher) 24 h after treatment. Alternatively, PR8-infected mice were injected i.n. with AF647-HDM at day 7 after infection. Twenty-four hours later, lung-single-cell suspensions were obtained, and lung DCs were selected as CD45⁺CD3e[–]CD19[–]SiglecF[–]Ly-6G[–]NK1.1[–]MHC-II⁺CD11c⁺ cells and were then subdivided into CD11b[–]CD103⁺, CD11b⁺Ly-6C[–] and CD11b⁺Ly-6C⁺ subsets by flow cytometry (see Fig. 6a). Alternatively, mice were also treated with NEi, Cl-amidine or DNase as described above.

Neutrophils/BMDcs co-culture experiments. To generate BMDcs, BM cells were isolated from naive BALB/c mice and were grown for 7 d in GM-CSF-containing medium, as described³³. Vehicle, LPS^{lo} and LPS^{hi} neutrophils were isolated 24 h after treatment. In total, 2.5×10^5 neutrophils were seeded into 48-well plates previously coated with poly-D-lysine hydrobromide (Sigma) in supplemented D-MEM medium (Gibco) and allowed to adhere for 2 h. BMDcs were then added to neutrophil cultures at a ratio of 1:1. Finally, AF647-HDM (500 ng ml^{–1}) and DNase I (400 IU ml^{–1}, Sigma-Aldrich) were added to the culture. Twelve hours later, cells were collected, washed, resuspended in FACS medium and stained for flow cytometry analysis.

Influenza A virus infection protocol. Influenza A virus strain A/PR8/34 (H1N1) was kindly provided by F. Trottein (Institut Pasteur). The viral stock suspension (10^8 PFU ml^{–1}) was diluted, and 5 PFU were administered i.n. to isoflurane-anesthetized mice in 50 μ l of PBS.

Assessment of viral mRNA expression. Lung apical lobes were excised, and total mRNA was isolated from homogenized tissue according to the Immgen protocol (www.immgen.org). cDNA was obtained with RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher Scientific), and qPCR was performed in duplicate with iQ Universal SYBR green supermix (Biorad) and ABI 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Primer sequences were as follows: 5'-TTCAACATTCGCTTCTCTTC-3' and 5'-CCCATTCATCTACTGCTTC-3' for viral NS1, 5'-AGCCAGTGTATACCAAG-3' and 5'-ACCAAGAACAA GCACAAGG-3' for housekeeping gene *Ubc*, 5'-TGGCAAAGTGGAGATTGTG CC-3' and 5'-AAGATGGTGATGGGCTTCCCG-3' for housekeeping gene *Gapdh*, 5'-CATGGCTCGCTCGGTGACC-3' and 5'-AATGTGAGGCGGG TGGAACTG-3' for housekeeping gene *B2m*. Expression levels of NS1 were normalized relative to the three control genes (*Ubc*, *B2m* and *Gapdh*).

Model of PR8-triggered allergic asthma to HDM. Seven days after infection, mice were administered i.n. with 40 μ g of HDM. Seven days later (day 7), all mice were challenged by i.n. instillation of 10 μ g of HDM. Three days after the challenge, animals were killed and features of allergic airway inflammation were assessed, as described above. In addition, levels of HDM-specific IgG1 were quantified, as described²⁰.

Model of ozone-triggered allergic asthma to HDM. Naive mice were exposed for 3 consecutive days to 2 ppm ozone during 3 h. Twenty-four hours after the last ozone exposure, mice were administered i.n. with 40 μ g of HDM. Seven days later, mice were challenged with 10 μ g of HDM, and features of allergic airway inflammation were assessed 3 d later as described above.

Statistical analysis. Respect of the assumptions of normal distribution of residuals and homoscedasticity was verified, and data were presented as mean \pm s.e.m., as well as individual values, unless otherwise indicated. Data from independent experiments were pooled for analysis in each data panel, unless otherwise indicated. Statistical analyses were performed with Prism 6 (GraphPad Software). We considered a *P* value lower than 0.05 as significant.

Reporting Summary. Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

NATURE IMMUNOLOGY

ARTICLES

Data availability

The scRNA-seq data provided in this manuscript have been deposited in the ArrayExpress database at EMBL-EBI (<https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/experiments/E-MTAB-6902>) under accession number E-MTAB-6902. The figures that have associated scRNA-seq data are the following: Fig. 2, Supplementary Figs. 2 and 3. The source data underlying Fig. 1a–d,f, 2d, 3b,c,f,g,i,k, 4b–e,g,i–k,m, 5b–e,g, 6b,d,f, 7b–i,k–m and 8a–c,e,f–h,j and Supplementary Figs. 1b,d, 4c,d, 5b,c,e,g, 6b, 7b–d,f,g,i,j and 8a are provided as a Source Data file. Any data that support the findings of this study are available from the corresponding authors upon request.

References

42. Sabatel, C. et al. Exposure to bacterial CpG DNA protects from airway allergic inflammation by expanding regulatory lung interstitial macrophages. *Immunity* **46**, 457–473 (2017).
43. Gentleman, R. C. et al. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.* **5**, R80 (2004).
44. Macosko, E. Z. et al. Highly parallel genome-wide expression profiling of individual cells using nanoliter droplets. *Cell* **161**, 1202–1214 (2015).

Reporting Summary

Nature Research wishes to improve the reproducibility of the work that we publish. This form provides structure for consistency and transparency in reporting. For further information on Nature Research policies, see [Authors & Referees](#) and the [Editorial Policy Checklist](#).

Statistics

For all statistical analyses, confirm that the following items are present in the figure legend, table legend, main text, or Methods section.

n/a Confirmed

- ☐ ☒ The exact sample size (n) for each experimental group/condition, given as a discrete number and unit of measurement
- ☐ ☒ A statement on whether measurements were taken from distinct samples or whether the same sample was measured repeatedly
- ☐ ☒ The statistical test(s) used AND whether they are one- or two-sided
Only common tests should be described solely by name; describe more complex techniques in the Methods section.
- ☒ ☐ A description of all covariates tested
- ☐ ☒ A description of any assumptions or corrections, such as tests of normality and adjustment for multiple comparisons
- ☐ ☒ A full description of the statistical parameters including central tendency (e.g. means) or other basic estimates (e.g. regression coefficient) AND variation (e.g. standard deviation) or associated estimates of uncertainty (e.g. confidence intervals)
- ☐ ☒ For null hypothesis testing, the test statistic (e.g. F , t , r) with confidence intervals, effect sizes, degrees of freedom and P value noted
Give P values as exact values whenever suitable.
- ☒ ☐ For Bayesian analysis, information on the choice of priors and Markov chain Monte Carlo settings
- ☒ ☐ For hierarchical and complex designs, identification of the appropriate level for tests and full reporting of outcomes
- ☒ ☐ Estimates of effect sizes (e.g. Cohen's d , Pearson's r), indicating how they were calculated

Our web collection on [statistics for biologists](#) contains articles on many of the points above.

Software and code

Policy information about [availability of computer code](#)

Data collection

Cell Ranger software (v1.2.0) (10x Genomics) was used to demultiplex Illumina BCL files to FASTQ files (cellranger mkfastq), to perform alignment (to mouse GRCh38/mm10 genome), filtering, UMI counting and to produce gene – barcode matrices (cellranger count).

Data analysis

Single cell analysis used R bioconductor (version 3.4.2.), and the R package Seurat (version 2.1.0). Statistical enrichment tests for GO biological processes were performed with PANTHER 13.1. Flow cytometry analysis were performed with FlowJo (version 10.1, Tree Star, Ashland, USA). Immunofluorescence images were acquired on a Zeiss LSM 880 Airyscan Elyra S.1. confocal microscope (Zeiss) and analyzed using the ImageJ (version 15.1n) and Imaris (version 7.5.2) softwares. Statistics: GraphPad Prism 6 for PC, R Bioconductor.

For manuscripts utilizing custom algorithms or software that are central to the research but not yet described in published literature, software must be made available to editors/reviewers. We strongly encourage code deposition in a community repository (e.g. GitHub). See the Nature Research [guidelines for submitting code & software](#) for further information.

Data

Policy information about [availability of data](#)

All manuscripts must include a [data availability statement](#). This statement should provide the following information, where applicable:

- Accession codes, unique identifiers, or web links for publicly available datasets
- A list of figures that have associated raw data
- A description of any restrictions on data availability

The scRNA-seq data provided in this manuscript have been deposited in the ArrayExpress database at EMBL-EBI (<https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/experiments/E-MTAB-6902>) under accession number E-MTAB-6902. The figures that have associated raw data are the following: Fig. 2, Supplementary Figs. 2,3.

Field-specific reporting

Please select the one below that is the best fit for your research. If you are not sure, read the appropriate sections before making your selection.

☒ Life sciences ☐ Behavioural & social sciences ☐ Ecological, evolutionary & environmental sciences

For a reference copy of the document with all sections, see [nature.com/documents/nr-reporting-summary-flat.pdf](https://www.nature.com/documents/nr-reporting-summary-flat.pdf)

Life sciences study design

All studies must disclose on these points even when the disclosure is negative.

Sample size	We assume that variance will be equal between experimental groups. We estimate that a difference will be biologically significant between two groups if a variation of at least 50% is observed between the mean of the two groups. If we want to compare two means of 1500 and 3000 with a standard deviation of 750 (example from the number of eosinophils in the bronchoalveolar lavage fluid of asthmatics and controls mice), the results of power analysis for expecting effects show that for a power of 0.9 (and $\alpha < 0.05$) in a t student test, the required sample size would be 3-5 animals. In most of the experiments, 3 to 10 mice/group was sufficient to identify differences between groups with at least 90% power and a 5% significance level.
Data exclusions	No data was excluded from the analyses.
Replication	For each experiment, each experimental group was composed of 3-5 mice constituting biological replicates. Each experiments have been repeated two to four times. All attempts at replication were successful and gave similar readout.
Randomization	Female age-matched BALB/c mice were randomly allocated into experimental groups.
Blinding	Blinding was only relevant for histological analysis of H&E and PAS stained-lung sections. All other conclusions were made based on quantitative parameters and statistical significance.

Reporting for specific materials, systems and methods

We require information from authors about some types of materials, experimental systems and methods used in many studies. Here, indicate whether each material, system or method listed is relevant to your study. If you are not sure if a list item applies to your research, read the appropriate section before selecting a response.

Materials & experimental systems

n/a	Involved in the study
<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> Antibodies
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Eukaryotic cell lines
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Palaeontology
<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> Animals and other organisms
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Human research participants
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Clinical data

Methods

n/a	Involved in the study
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> ChIP-seq
<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> Flow cytometry
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> MRI-based neuroimaging

Antibodies

Antibodies used	Anti-mouse FITC-, and V500-conjugated anti-CD45.2 (clone 104, dilution 1/100, #561874, #562130), PE-conjugated anti-CD3 (clone 142-2C11, dilution 1/100, #553064), PE-conjugated anti-CD19 (clone 1D3, dilution 1/300, #553786), PE-conjugated anti-NK1.1 (clone pk136, dilution 1/300, #553165), PE-conjugated anti-Siglec-F (clone E50-2440, dilution 1/500, #552126), PE-conjugated anti-Ly6G (clone 1A8, dilution 1/500, #551461), eFluor450- and PE-Cy7-conjugated anti-CD11b (clone M1/70, dilution 1/300, #560455, #561098), PE-Cy7-conjugated anti-Ly6G (clone 1A8, dilution 1/200, #560501), APC-Cy7-conjugated anti-CD11c (clone HL3, dilution 1/150, #561241), PE-CF594-conjugated anti-Ly6C (clone 49-44, dilution 1/200, #562728), FITC-conjugated anti-CD103 (clone M290, dilution 1/100, #557494) and PE-conjugated anti-Lamp-1 (CD107a) (clone 1D4B, dilution 1/100, #558661), Anti-mouse PE-conjugated anti-CXCR4 (clone 2B11, dilution 1/100, #561734) antibodies were purchased from BD biosciences. Anti-mouse PE-conjugated anti-CD49d (clone R1-2, dilution 1/100, #12-0492-81) antibodies were purchased from eBioscience. Anti-mouse PerCP-Cy5.5-conjugated anti-MHC-II (Ia-Ie) (clone M5/M4,15,2, dilution 1/1000, #107626) and BV421-conjugated anti-CD64 (clone X54-5/7.1, dilution 1/100, #139309) antibodies were purchased from Biolegend. Unconjugated Goat anti-myeloperoxidase (dilution 1/40, #AF3667) was purchased from R&D systems and unconjugated rabbit anti-histone H3 citrullinated (dilution 1/100, #ab5103) was purchased from abcam.
Validation	All the antibodies are from commercial sources and purchased from BD pharmingen, Ebioscience, biolegend, R&D systems and abcam. The data sheets were provided by the manufacturer, in which the validation of antibodies for the specificity to the mouse antigen and for the usage for flow cytometry/western blot/confocal microscopy was confirmed. Statements about validation are found in manufacturer's website.

Animals and other organisms

Policy information about [studies involving animals](#): [ARRIVE guidelines](#) recommended for reporting animal research

Laboratory animals	Mus musculus, BALB/c, female, 6 to 10 weeks
Wild animals	The study did not involve wild animals.
Field-collected samples	The study did not involve samples collected from the field.
Ethics oversight	All animal experiments described in this study were reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Liège. The "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals", prepared by the Institute of Laboratory Animal Resources, National Research Council, and published by the National Academy Press, as well as European and local legislations, were followed carefully.

Note that full information on the approval of the study protocol must also be provided in the manuscript.

Flow Cytometry

Plots

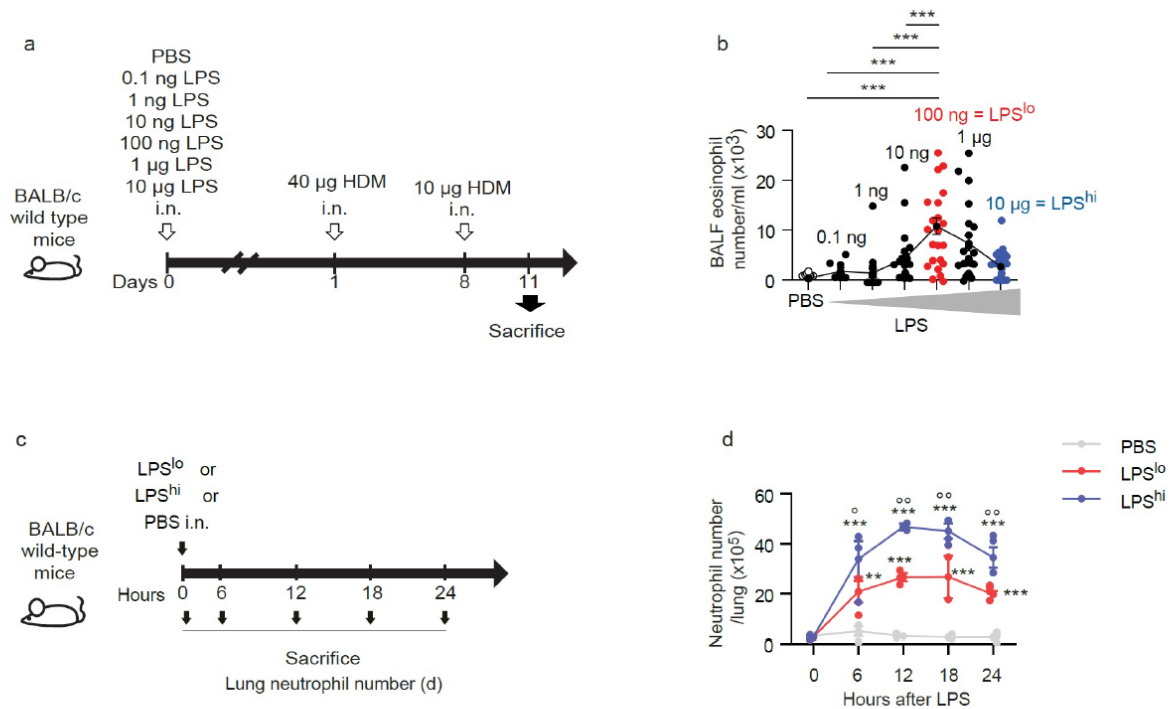
Confirm that:

- ☒ The axis labels state the marker and fluorochrome used (e.g. CD4-FITC).
- ☒ The axis scales are clearly visible. Include numbers along axes only for bottom left plot of group (a 'group' is an analysis of identical markers).
- ☒ All plots are contour plots with outliers or pseudocolor plots.
- ☒ A numerical value for number of cells or percentage (with statistics) is provided.

Methodology

Sample preparation	To obtain single-lung-cell suspensions, lungs were perfused with 10 ml of PBS through the right ventricle, cut into small pieces, and digested for 1 h at 37°C in HBSS containing 1 mg/ml collagenase A (Roche) and 0.05 mg/ml DNase I (Roche). Blood was collected in an EDTA-containing tube (100 mM), and red blood cells were lysed with RBC lysis buffer (eBioscience). BM cells were isolated by flushing femurs with PBS. Staining reactions were performed at 4°C after incubation with 2.4G2 Fc receptor blocking antibodies to avoid non-specific binding. Anti-mouse Lamp-1 intracellular staining was performed using the Foxp3/Transcription factor Staining Buffer Set from eBiosciences according to the manufacturer's instructions. Briefly, after extracellular staining, cells were resuspended in 200 µl of Fix/Perm buffer for 45 minutes at 4°C in the dark and then washed with 200 µl of permeabilization buffer. Cells were then stained for intracellular protein in permeabilization buffer for 35-40 minutes.
Instrument	Cell phenotyping and sorting were performed on a FACSCANTO II and a FACSARIA III (BD Biosciences), respectively.
Software	FlowJo (version 10.1, Tree Star, Ashland, USA)
Cell population abundance	Purity was between 90 and 95% and was determined by flow cytometry after sorting.
Gating strategy	Lung dendritic cells (DCs) were selected as CD45+CD3e-CD19-Siglec-F-Ly6G-NK1.1-MHCII+CD11c+ cells and were then subdivided into CD11b-CD103+, CD11b+Ly-6C- and CD11b+Ly-6C+ subsets; lung neutrophils were selected as SSChighCD45.2+CD11bhighLy-6Ghigh cells. Bone marrow dendritic cells (BMDCs) were selected as MHC-II+CD11c+ cells and further divided between CD11b+Ly-6C+ and CD11b+Ly-6C- subsets.

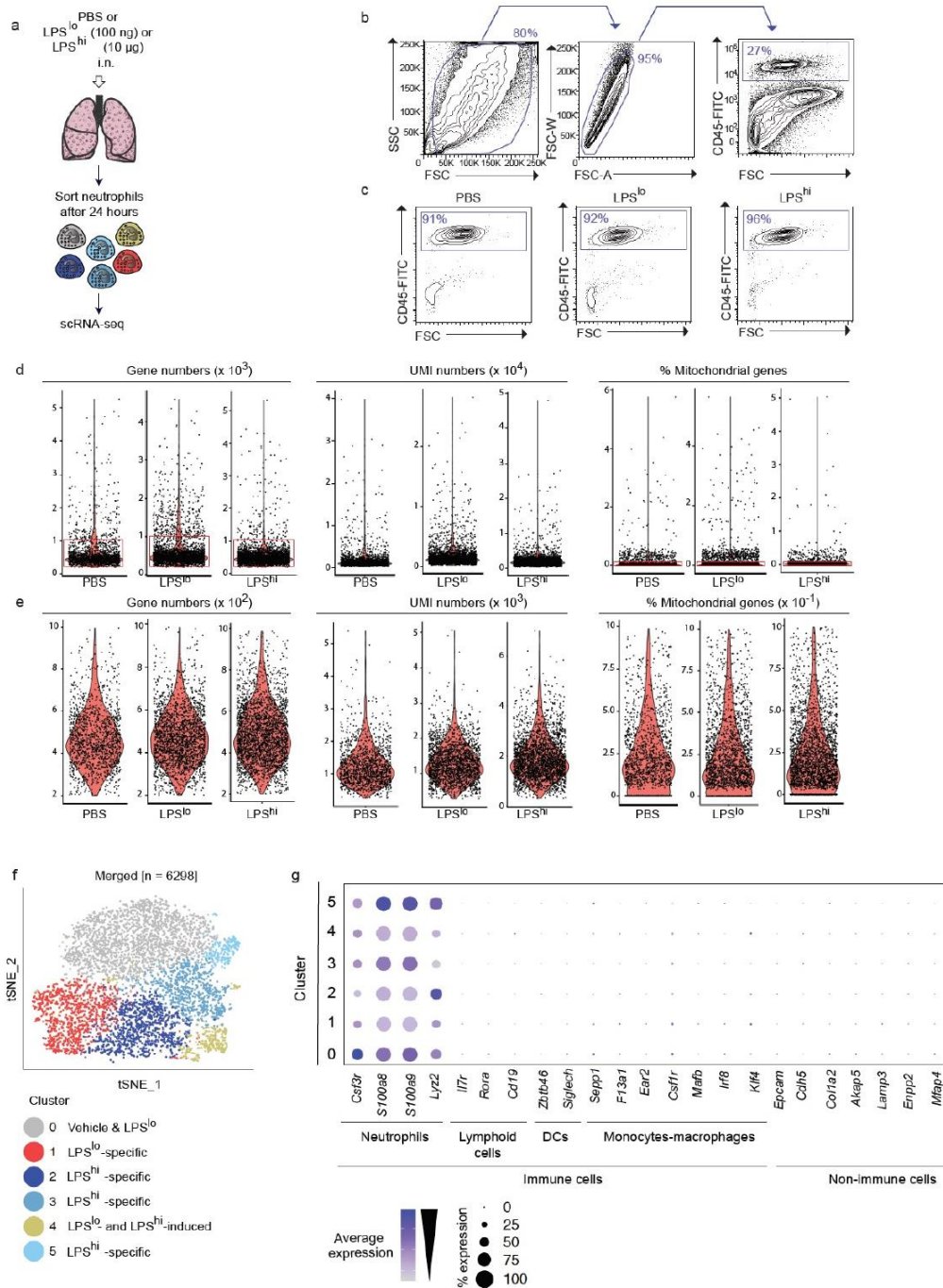
- ☒ Tick this box to confirm that a figure exemplifying the gating strategy is provided in the Supplementary Information.



Supplementary Figure 1

BALB/c wild-type mice administered i.n. with different LPS doses exhibit distinct profiles of innate neutrophil recruitment and HDM-induced airway eosinophilia

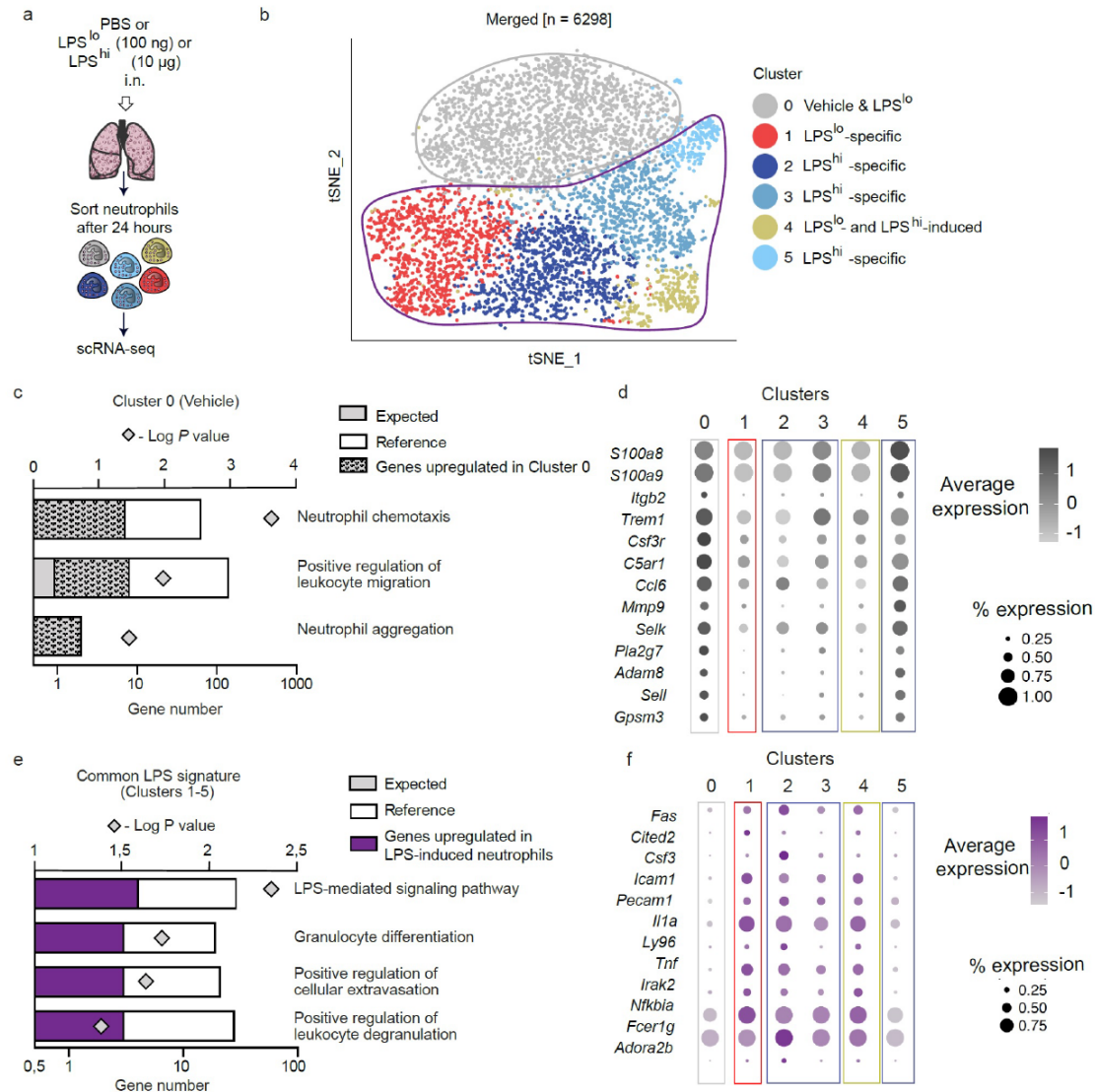
a, Experimental outline for panel **b**. **b**, Eosinophil cell counts in the broncho-alveolar lavage fluid (BALF), assessed 3 d after the second HDM administration in mice exposed to different doses of LPS, ranging from 0.1 µg and 10 µg and instilled i.n. with 40 and 10 µg HDM, 1 and 8 d later, respectively. Data shown are mean ± s.e.m and are pooled from 4 independent experiments (PBS; LPS 0.1 ng; 1 ng; 10 ng; 100 ng; 1 µg; 10 µg; n = 9;16;22;20;23;24;25 mice per group, respectively). **c**, Experimental outline for panel **d**. **d**, Absolute numbers of lung CD45⁺CD11b^{hi}Ly-6G^{hi} neutrophils assessed over time after i.n. vehicle, low-dose LPS (LPS^{lo}) or high-dose LPS (LPS^{hi}) exposure. Data show mean ± s.e.m. and are pooled from 2 independent experiments (n = 3 [PBS, LPS^{lo}] or 4 [LPS^{hi}] mice per group). P values were calculated using (b) a one-way or (d) a two-way ANOVA with Tukey's *post hoc* test. In d, the symbol * compares the indicated group vs. PBS; the symbol ° compares LPS^{lo} vs. LPS^{hi} groups. °P < 0.05; **/°P < 0.01; ***P < 0.001. i.n., intranasal.



Supplementary Figure 2

Lung neutrophils from vehicle, LPS^{lo} and LPS^{hi} mice were isolated and subjected to droplet-based scRNA-seq and quality control filtering and analysis.

a, Simplified experimental outline for scRNA-seq analysis. **b**, Representative FACS sorting strategy of CD45⁺ cells after MACS neutrophil enrichment of lung single-cell suspensions ($n = 3$ pooled mice per group). One PBS-injected mouse is shown. **c**, Post-sort purity of FACS-sorted CD45⁺ cells from vehicle, LPS^{lo} and LPS^{hi} mice 24 h after treatment. Representative post-sort flow cytometry dot plots are shown. Insets indicate the percentage of cells within the indicated gate. **d, e**, Gene numbers (left), Unique Molecular Identifiers (UMI) numbers (middle) and percentage of mitochondrial genes (right) detected in vehicle, LPS^{lo} and LPS^{hi} neutrophils before (**d**) and after (**e**) selection and filtering, presented as violin plots (height: gene numbers [left], UMI numbers [middle] and percentage of mitochondrial genes [right]; width: abundance of cells) and individual dots representing individual cells. The red frames indicate cells that were selected for downstream analyses. **f**, tSNE plots depicting the transcriptional identity of neutrophils merged from vehicle, LPS^{lo} and LPS^{hi} mice 24 h after treatment, analyzed by scRNA-seq. **g**, Dot plots showing average expression of the indicated genes and percentage of cells expressing the indicated genes within each cluster. High expression of *S100a8*, *S100a9* and *Csf3r* identified the 6 clusters as neutrophils, which was further supported by the virtual absence of expression of markers of other cell types.

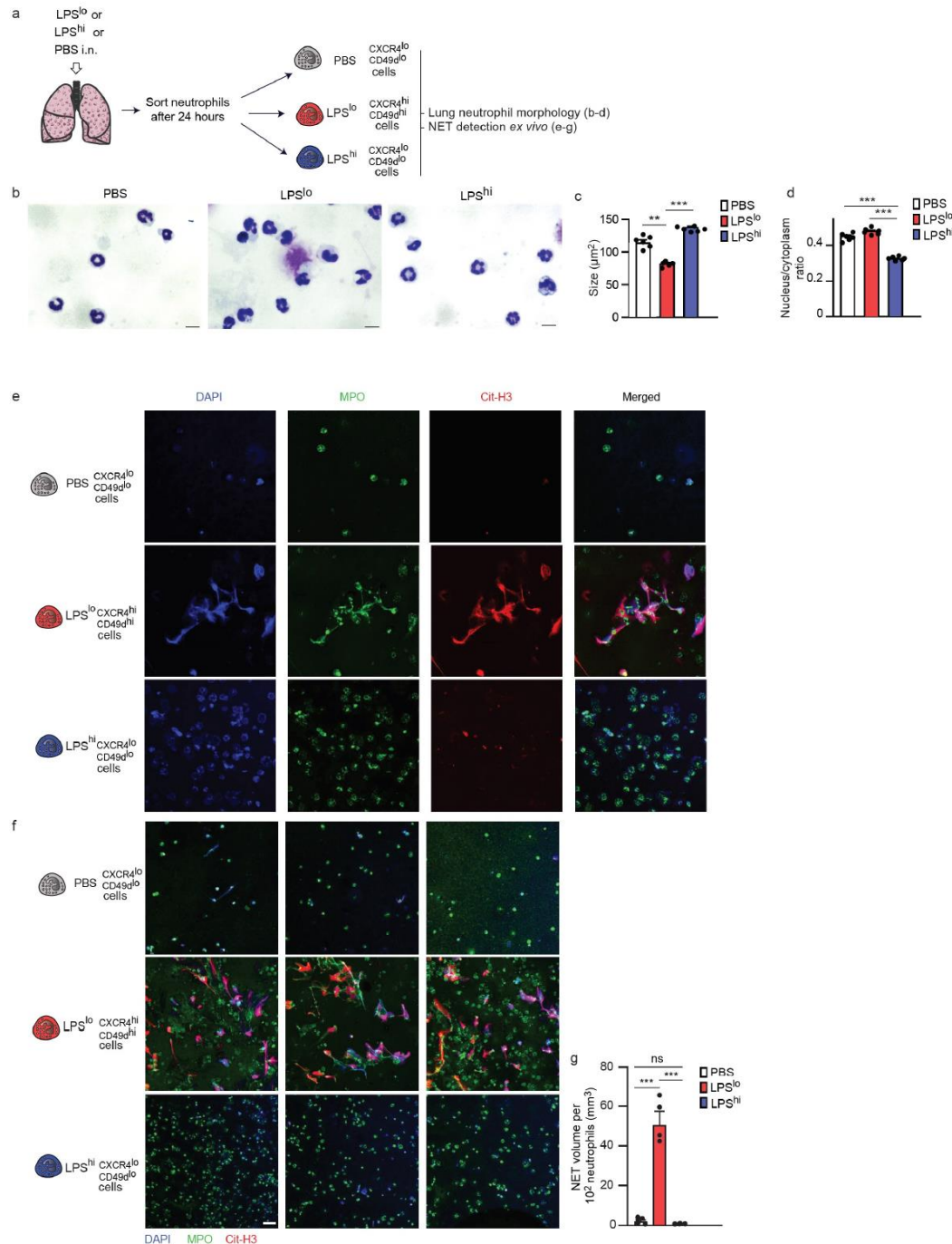


Supplementary Figure 3

Clusters identified by scRNA-seq were analyzed for differential gene expression

a, Simplified experimental outline for scRNA-seq analysis. **b**, tSNE plots depicting the transcriptional identity of neutrophils merged from vehicle, LPS^{lo} and LPS^{hi} mice 24 h after treatment, analyzed by scRNA-seq ($n = 3$ pooled mice/condition). **c**, PANTHER GO statistical enrichment tests on the genes significantly upregulated in cluster 0 as compared to the other clusters. **d**, Dot plots showing average expression of the indicated genes and percentage of cells expressing the indicated genes within neutrophil clusters. Depicted genes belong to the lists of genes characterizing the biological responses shown in **c**. **e**, PANTHER GO statistical enrichment tests on the common LPS signature. **f**, Dot plots, as in **d**. Depicted genes belong to the lists of genes characterizing the biological responses shown in **e**. (**c,e**) Number of genes (histograms) and $-\log P$ value (grey squares) of the enriched biological processes are plotted. P values

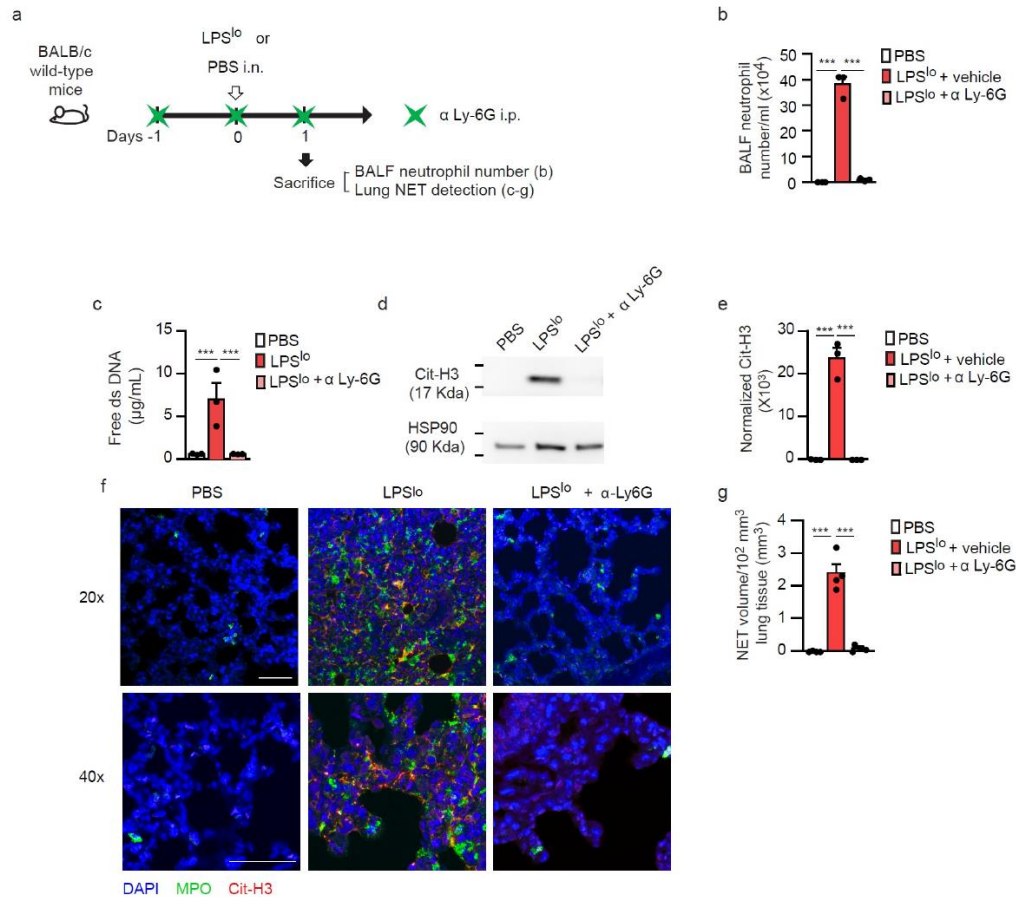
were calculated using a two-tailed Mann-Whitney U test with Benjamini-Hochberg False Discovery Rate (FDR) correction.



Supplementary Figure 4

LPS^{lo} neutrophils, unlike steady-state or LPS^{hi} neutrophils, are dedicated to form NETs *ex vivo*.

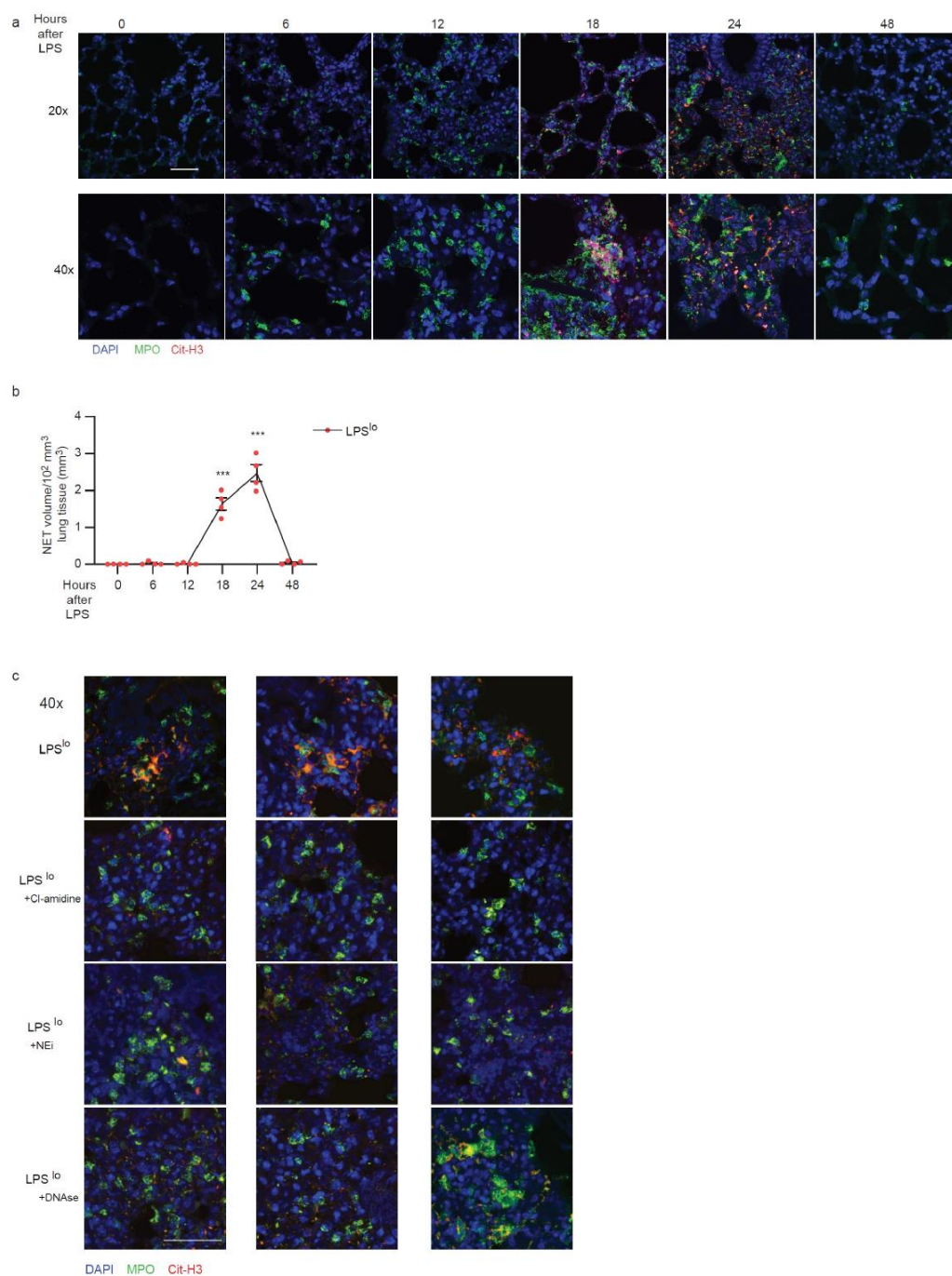
a, Experimental outline. **b**, Representative photographs of FACS-sorted CXCR4^{lo}CD49d^{lo}, CXCR4^{lo}CD49d^{hi} and CXCR4^{hi}CD49d^{lo} lung neutrophils from vehicle, LPS^{lo} and LPS^{hi} mice 24 h after treatment. **c**, Quantification of the size of neutrophils from mice as in **b**. **d**, Quantification of the nucleus/cytoplasm ratio of neutrophils from mice as in **b**. **e, f**, Representative high-resolution confocal microscopy pictures of Cit-H3⁺MPO⁺DAPI⁺ NETs released from *ex vivo*-cultured neutrophils as in **b**. **e**, Representative pictures of the individual and merged stainings, magnification 20x. **f**, Additional representative pictures of the merged stainings, magnification 10x. **g**, Quantification of NET volume in *ex vivo*-cultured neutrophils as in **b**. Data show mean + s.e.m., each symbol representing independent sorting experiments in which cells from 2–3 mice were pooled by group (**c, d, g**: $n = 6.4$ independent experiments, respectively). P values were calculated using a one-way ANOVA with Tukey's *post hoc* test. * $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. i.n., intranasal. ns, not significant. Scale bar = (**b**) 10 μm; (**e, f**) 50 μm.



Supplementary Figure 5

NETs are not detected in LPS^{lo} mice treated with α-Ly-6G neutrophil-depleting antibodies

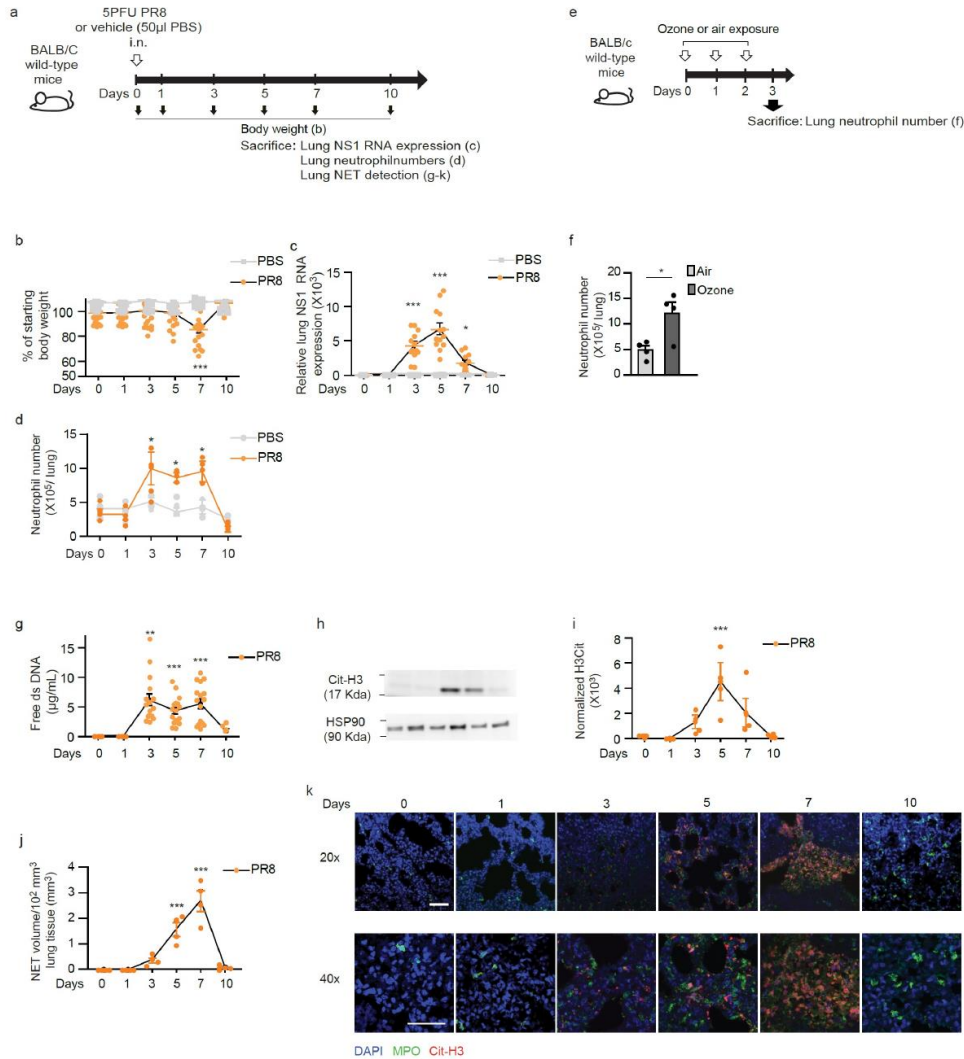
a, Experimental outline. b, Neutrophil cell counts in the broncho-alveolar lavage fluid (BALF) of vehicle and LPS^{lo} mice treated or not i.p. with α-Ly-6G antibodies one day before, at the time of and one day after LPS^{lo} exposure. c, Levels of extracellular dsDNA in the BALF of mice as in b. d, Representative blots of Cit-H3 and HSP90α (loading control) assessed by Western blot of lung protein extracts from mice as in b. e, Quantification of normalized Cit-H3 levels in lung protein extracts of mice as in b. f, Confocal microscopy stainings of Cit-H3⁺MPO⁺ NETs on lung sections of mice as in b. Pictures shown are representative of one of >3 mice analyzed, each of them giving similar results. g, Quantification of NET volume in lung sections of mice as in b. (b,c,e,g) Data show mean + s.e.m., as well as individual mice, and (b,c,e) are representative of one of 3 independent experiments yielding similar results (b,c,e: n = 3 mice per group; g: n = 4 mice per group). P values were calculated using a one-way ANOVA with Tukey's *post hoc* test. ***P < 0.001. BALF, bronchoalveolar lavage fluid; i.p., intraperitoneal; ns, not significant. Scale bar = 50 μm.



Supplementary Figure 6

NETs appear in the lung 18 h after LPS^{lo} exposure and are impaired in lungs of LPS^{lo} mice treated with DNase, Cl-amidine or NEI

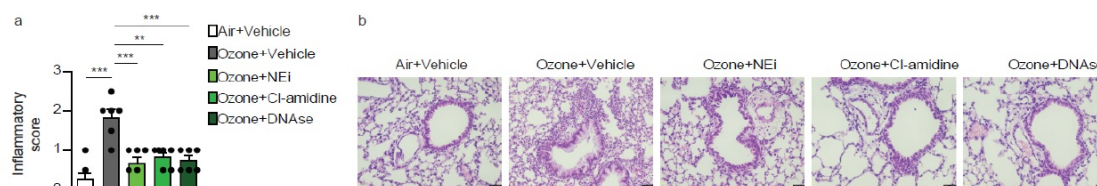
a, Confocal microscopy stainings of Cit-H3⁺MPO⁺ NETs on lung sections of mice 0, 6, 12, 18, 24 and 48 h after LPS^{lo} treatment. Pictures are representative of one of 4 mice analyzed, each of them giving similar results. **b**, Quantification of NET volume on lung sections of mice as in **a**. **c**, Confocal microscopy stainings of Cit-H3⁺MPO⁺ NETs on lung sections, assessed 24 h after LPS^{lo} in mice treated i.p. with DNase one day before and at the time of LPS^{lo} treatment, or treated 4 times i.p. with NEi or Cl-amidine, every 12 h starting one day before LPS^{lo}. Pictures are representative of one of 5 mice analyzed, each of them giving similar results. Quantification of NET volume is shown in Fig. 5b. (b) Data show mean + s.e.m., as well as individual mice ($n = 4$ per time point). P values were calculated using a one-way ANOVA with Tukey's *post hoc* tests and compare the indicated time points with the baseline (hour 0). *** $P < 0.001$. NEi, neutrophil elastase inhibitor. Scale bar = 50 μ m.



Supplementary Figure 7

NET-releasing neutrophils are recruited to the lungs on influenza virus PR8 infection and ozone exposure

a, Experimental outline for panels **b–d** and **g–k**. **b**, Body weight expressed as the % of body weight before influenza virus (H1N1 strain PR8) infection, assessed over time in PBS-injected and PR8-infected mice. **c**, Lung relative RNA expression of viral non-structural protein 1 (NS1) assessed by RT-qPCR over time in PBS-injected or PR8-infected mice. **d**, Absolute numbers of lung CD45⁺CD11b^{hi}Ly-6G^{hi} neutrophils assessed over time in PBS-injected or PR8-infected mice. **e**, Experimental outline for **f**. **f**, Absolute numbers of lung CD45⁺CD11b^{hi}Ly-6G^{hi} neutrophils assessed in air-exposed and ozone-exposed mice 1 d after the last ozone exposure. **g**, Levels of extracellular dsDNA in the BALF of mice following PR8 infection. **h**, Representative blots of Cit-H3 and HSP90α (loading control) assessed by Western blot of lung protein extracts of mice following PR8 infection. **i**, Quantification of normalized Cit-H3 levels in lung protein extracts of mice following PR8 infection. **j**, Quantification of NET volume in lung sections of mice following PR8 infection. **k**, Confocal microscopy stainings of Cit-H3⁺MPO⁺ NETs on lung sections of mice following PR8 infection. Pictures shown are representative of one of 4 mice analyzed, each of them giving similar results. (**b,c**) Data show mean ± s.e.m. and are pooled from 4 independent experiments, each symbol representing individual mice, ([b] PBS: $n = 20, 20, 20, 18, 19, 20$ at days 0, 1, 3, 5, 7, 10, respectively; PR8: $n = 20, 20, 20, 18, 20, 10$ at days 0, 1, 3, 5, 7, 10, respectively; [c] PBS: $n = 8$ at each time point; PR8: $n = 8, 8, 13, 13, 12, 8$ at days 0, 1, 3, 5, 7, 10 respectively). (**d,f**) Data show mean (d) ± s.e.m. and are pooled from 2 independent experiments, each symbol representing individual mice ($n = 3–4$ mice per group). (**g,i,j**) Data show mean ± s.e.m. and are pooled from 3–5 independent experiments, each symbol representing (g,i,j) individual mice ($n = 9, 7, 16, 17, 16, 7$ at days 0, 1, 3, 5, 7, 10, respectively; $n = 4$ mice per time point), or (i) independent experiments in which lungs from 3–5 mice were pooled by group ($n = 4$ independent experiments). P values were calculated using (**b,c,d**) a two-way ANOVA with Tukey's *post hoc* test and compare PBS vs. PR8 at the indicated time points, (**f**) a two-tailed unpaired Student's *t* test or (**g,i,j**) a one-way ANOVA with Tukey's *post hoc* test and compare the indicated time points with the baseline. $P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$; $^{***}P < 0.001$. BALF, bronchoalveolar lavage fluid; ns, not significant i.n., intranasal; PFU, plaque forming unit. Scale bar = 50 µm.



Supplementary Figure 8

Ozone-potentiated HDM-induced perivascular and peribronchial leukocyte infiltration is decreased upon treatment with NEI, Cl-Amidine or DNase

a, Inflammatory score estimating perivascular and peribronchial inflammation, quantified from H&E-stained lung sections 3 d after the second HDM administration in vehicle-HDM and ozone-HDM mice treated daily for 4 d with DNase i.p., starting the first day of ozone exposure, or treated every 12 h with NEI or Cl-amidine i.p., for the same duration as for DNase. **b**, Representative H&E staining of lung sections of mice as in **a**. Pictures are representative of one of 6 mice analyzed, each of them giving comparable results. (**a**) Data show mean + s.e.m. and are pooled from 2 independent experiments ($n = 6$ mice per group). P values were calculated using a one-way ANOVA with Tukey's *post hoc* test. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. NEI, neutrophil elastase inhibitor. Scale bar = 32 μm .

Discussion - Perspectives

Discussion-Perspectives

Au cours de ce travail, nous avons démontré qu'une exposition à une faible dose de LPS, mimant un environnement « hygiénique », une infection virale respiratoire au virus influenza A H1N1 et une exposition à l'ozone induisent tous trois le recrutement pulmonaire de neutrophiles. Ces neutrophiles présentent un phénotype particulier, similaire dans les trois environnements, en comparaison aux neutrophiles pulmonaires de souris contrôles, et exercent une fonction commune via la libération de NETs. Le phénotype particulier de ces neutrophiles n'est pas retrouvé au niveau des neutrophiles sanguins ou de la moelle osseuse des souris exposées aux trois environnements pro-allergiques et est donc acquis par les neutrophiles lors de leur entrée dans le poumon. Dans le modèle de pré-exposition à une faible dose de LPS, l'inhibition du recrutement de ces neutrophiles au niveau du poumon suffit à diminuer les caractéristiques de l'asthme allergique suite à l'exposition ultérieure à des extraits d'acariens (HDM), et leur transfert à des souris naïves permet à lui seul de restaurer l'inflammation allergique pulmonaire à l'encontre du HDM. Ils sont donc nécessaires et suffisants pour induire l'asthme allergique. Par ailleurs, l'inhibition de la formation ou la dégradation des NETs permet de diminuer significativement les paramètres de l'asthme allergique mesurés. Nos données supportent que les NETs potentialisent la sensibilisation allergique en augmentant l'internalisation de l'allergène et l'expression de la molécule de co-stimulation CD86 par les moDCs.

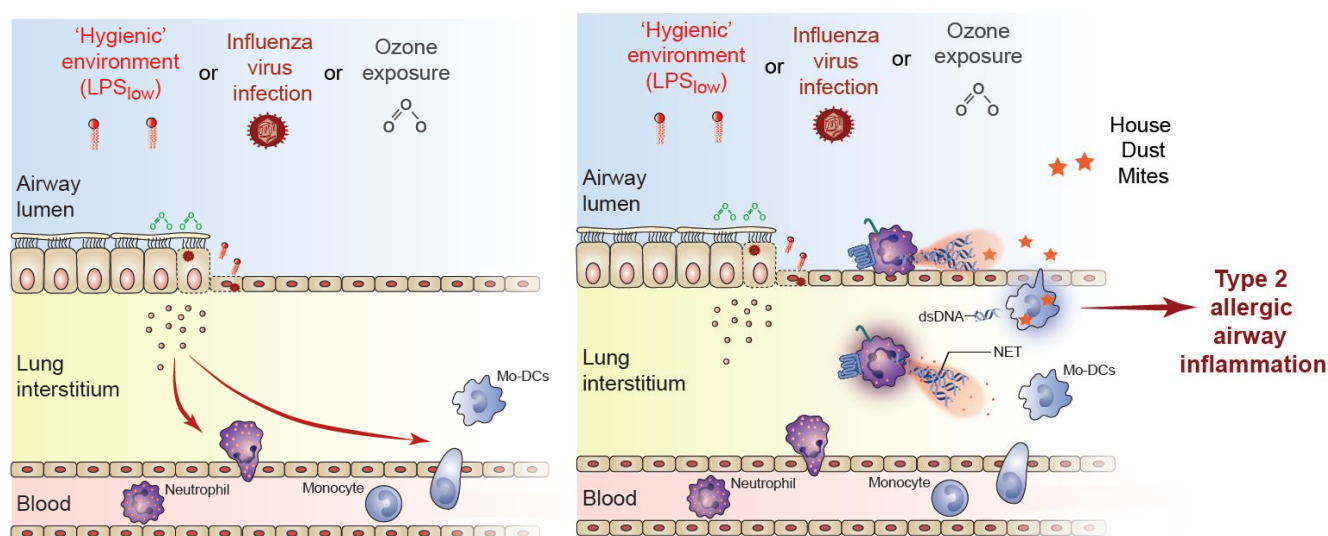


Figure 11 : Modèle d'induction de la sensibilisation allergique induite par des environnements pro-allergiques. Image 1 : Trois environnements pro-allergiques induisent le recrutement de neutrophiles au niveau du poumon. Image 2 : Ces neutrophiles acquièrent un phénotype particulier lors de leur entrée dans le poumon et libèrent des NETs. Ces NETs augmentent la capture de l'antigène (HDM) par les moDCs et favorisent le développement de la sensibilisation allergique et de l'asthme.

Les modèles utilisés dans cette étude reposent sur l'utilisation de trois conditions expérimentales mimant des environnements pro-allergiques. Tout d'abord, le modèle utilisé pour représenter un

environnement hygiénique, associé à de faibles doses de LPS, est une adaptation d'un modèle publié par Eisenbarth et collègues (Eisenbarth et al., 2002). Les doses de LPS administrées dans notre modèle ont d'abord été testées dans une expérience pilote. Les doses de 0.1 à 10 ng n'induisent pas d'inflammation éosinophilique à l'encontre du HDM, les doses de 10 ng à 1 µg engendrent une inflammation éosinophilique tandis que cette inflammation n'est plus présente suite à une exposition à 10 µg de LPS. Dans leur étude, Eisenbarth et collègues observent une réponse Th2 à l'encontre de l'ovalbumine à la dose de 100 ng de LPS, alors qu'une réponse Th1 est induite à la forte dose de LPS de 100 µg. Dans notre modèle, nous nous sommes concentrés sur l'effet des faibles doses de LPS et n'avons pas investigué en détails la réponse induite par les fortes doses de LPS. Nous observons une faible augmentation de la synthèse de l'IFN-γ par les cellules ganglionnaires de souris exposées aux fortes doses de LPS et restimulées ex vivo (fig. sup. 1). Néanmoins, nous n'observons pas d'augmentation des neutrophiles dans le lavage bronchoalvéolaire (données non montrées), et le score inflammatoire pulmonaire est faible, identique à celui de souris naïves, au niveau des poumons des souris traitées aux fortes doses de LPS.

Le deuxième environnement pro-allergique utilisé est un modèle de sensibilisation allergique consécutive à une infection au virus influenza A H1N1. Ce dernier n'est pas le virus le plus souvent associé à une augmentation de l'asthme allergique (Busse et al., 2010b), contrairement au RSV ou au RV. Cependant, des études montrent que l'impact du virus influenza chez les jeunes enfants est très probablement sous-estimé dû à des méthodes de diagnostics moins sensibles (Poehling et al., 2006). De plus, l'augmentation de la sensibilisation allergique par le virus influenza est d'autant plus intrigante d'un point de vue mécanistique puisque le virus influenza est un virus connu pour induire une réponse immunitaire Th1 typique (Kreijtz et al., 2011) contrairement au RSV qui induit une réponse pro-Th2 au niveau du poumon (Cormier et al., 2010). D'autre part, les souris sont très peu sensibles aux infections au RV et il n'existe pas d'équivalent murin à ce virus (Bartlett et al., 2015). Les cibles cellulaires des rhinovirus ainsi que leur affinité pour divers récepteurs cellulaires sont différentes chez l'homme et la souris. Les rhinovirus se lient aux récepteurs des lipoprotéines de faible densité chez la souris et aux ICAM-1 chez l'homme (Tuthill et al., 2003). Il existe dès lors, deux modèles d'infection au RV chez la souris. Il est possible d'utiliser des souris transgéniques exprimant les récepteurs ICAM-1 humains pour pouvoir réaliser un modèle murin d'infection par le sérotype majeur RV-16 (Bartlett et al., 2008). Une autre possibilité consiste à infecter des souris sauvages avec le sérotype mineur RV-1B. Cependant, dans ce modèle, la réplication des RV est très limitée dans le temps chez les souris (moins de 24 heures), ce qui présente une forte limitation de ce modèle (Gavala et al., 2011). De manière intéressante, l'étude de Bonnelykke a démontré que le nombre d'épisodes infectieux dans les débuts de la vie, mais pas particulièrement la souche virale impliquée, était associé à l'augmentation du risque de développement de l'asthme allergique (Bønnelykke et al., 2015).

Le dernier modèle se base sur une exposition à l'ozone. Les souris ont été exposées à 2 ppm d'ozone et ce à raison de 3 heures par jour pendant 3 jours consécutifs. Ces concentrations d'ozone correspondent approximativement à 20 fois les concentrations mesurées lors de pic de pollution. Cependant, les études épidémiologiques étudiant la corrélation entre l'exposition à l'ozone et l'induction de l'asthme allergique se basent en général sur des expositions de 8 heures par jour et ont souvent un caractère chronique, comme indiqué dans l'introduction (Kim et al., 2011; McDonnell et al., 1999).

Les trois environnements pro-allergiques provoquent le recrutement de neutrophiles au phénotype particulier au niveau du poumon. En effet, ces neutrophiles expriment de plus hauts niveaux des protéines CXCR4, CD49d et Lamp-1 en comparaison aux neutrophiles pulmonaires de souris contrôles ou aux neutrophiles recrutés dans le poumon suite à l'administration de fortes doses de LPS. Ces neutrophiles partagent quelques similitudes avec les neutrophiles dits « agés » (*aged neutrophils*), CXCR4^{hi}, présents dans la circulation sanguine et dont l'abondance suit une oscillation circadienne (Uhl et al., 2016). Les neutrophiles « pro-allergiques » partagent également des similarités phénotypiques avec une population de neutrophiles pro-angiogéniques CXCR4^{hi}CD49d^{hi} décrits chez la souris (Massena et al., 2015). Les neutrophiles agés ont, comme les neutrophiles pro-allergiques, une forte propension à libérer des NETs et surexpriment également le CD49d à leur surface (Uhl et al., 2016). Cependant, nous avons montré que l'expression de CXCR4 par les neutrophiles circulants ou les neutrophiles de la moelle osseuse n'était pas affectée par l'exposition aux différents environnements pro-allergiques (figure 3), suivait une modification circadienne dans le sang, comme attendu (Adrover et al., 2016), et que l'acquisition du phénotype particulier des neutrophiles avait lieu lors de leur entrée dans le poumon. Ces données supportent une certaine plasticité des neutrophiles, leur conférant la capacité de répondre à des changements de leur environnement, plutôt que la présence de sous-populations pré-définies de neutrophiles.

Lors de l'analyse de scRNAseq, nous avons certes observé un transcriptome différent pour les neutrophiles pulmonaires de souris exposées aux doses pro-allergiques de LPS mais ceci était également le cas pour les neutrophiles pulmonaires de souris exposées aux fortes doses de LPS. De plus, nous avons observé que ces neutrophiles « *LPS_{high}* » présentaient une morphologie distincte des autres neutrophiles, caractérisée par une taille en moyenne plus grande, un noyau moins segmenté et un rapport noyau/cytoplasme plus petit (figure sup 4). Ces neutrophiles semblent donc également différents des neutrophiles de souris naïves. Les analyses de scRNAseq ont principalement été focalisées sur les neutrophiles pro-allergiques. Cependant, des analyses préliminaires ont permis de montrer une up-régulation des marqueurs *Id2*, *Fpr2*, *Chil1*, impliqués dans la régulation négative des réponses immunitaires (Gobbetti et al., 2014). De plus, lors des expériences de co-culture de BMDCs stimulées au HDM avec les neutrophiles dérivés de souris traitées aux fortes doses de LPS, la capture de l'antigène par les cellules CD11b⁺Ly6C⁻ était significativement diminuée (figure 6), ainsi que l'expression du

MHCII (données non montrées). Ces résultats préliminaires suggèrent un rôle potentiellement immunosuppresseur de ces neutrophiles que nous sommes en train d'investiguer en détail dans le laboratoire.

L'acquisition d'un phénotype particulier par les neutrophiles lors de leur entrée dans le poumon pourrait être due à un signal délivré par les cellules épithéliales, premières cellules en contact avec l'environnement. Plusieurs candidats peuvent être évoqués. Tout d'abord, les résultats des analyses de scRNAseq montrent une forte signature « interféron » au niveau des neutrophiles dérivés de souris exposées aux faibles doses, pro-allergiques de LPS. Les interférons peuvent induire des neutrophiles au phénotype particulier au niveau des tumeurs associé à une libération plus importante de NETs (Andzinski et al., 2016), et favorisent la libération de NETs dans d'autres modèles (Gul et al., 2018). Des alarmines, telles que l'IL-33, ainsi que le VEGF-A, peuvent également être sécrétées par les cellules épithéliales de patients asthmatiques (Cayrol and Girard, 2014; Hoshino et al., 2001; Meyer and Akdis, 2013; Préfontaine et al., 2010) et induites en réponse au LPS (Hammad and Lambrecht, 2015; Shin et al., 2015), à une infection par le virus influenza (Almansa et al., 2011; Le Goffic et al., 2011) et lors d'une exposition à l'ozone (Kubala et al., 2014; Michaudel et al., 2018; Wiegman et al., 2014). L'IL-33 joue un rôle dans le recrutement des neutrophiles dans l'arthrite rhumatoïde (Verri et al., 2010) et peut potentialiser la libération de NETs (Yazdani et al., 2018). D'autre part, le VEGF-A est responsable du recrutement des neutrophiles CXCR4^{hi} au niveau des zones ischémiques (Massena et al., 2015) et peut favoriser les réponses immunitaires Th2 (Lee et al., 2004).

La voie d'induction des NETs dans nos trois modèles n'a pas été élucidée. La libération de NETs est un phénomène complexe pouvant être induit par de très nombreux stimuli ainsi que par des voies de signalisation et des mécanismes de formation différents. Il est d'ailleurs probable que chacun des trois environnements pro-allergiques utilisés dans cette étude induisent la formation de NETs via des récepteurs et des cibles différents. Tout d'abord, la libération des NETs peut être provoquée par une interaction directe entre le neutrophile et le stimulus, ce qui impliquerait la présence des neutrophiles dans la lumière des voies aériennes. La localisation précise des neutrophiles libérant des NETs dans nos modèles n'a pas été clairement déterminée. Cependant, les images de microscopie confocale montrent une présence des NETs et des neutrophiles plutôt au niveau de l'interstitium 24 heures après l'exposition à des faibles doses de LPS ou lors du pic de l'infection virale (J3 à J7), mais aussi bien dans l'interstitium qu'au niveau de la lumière des bronches lors d'une exposition à l'ozone (figures 3 et 7). Toutefois, de nombreux neutrophiles sont présents dans le lavage broncho-alvéolaire de souris exposées aux trois environnements pro-allergiques, suggérant leur localisation également dans la lumière des voies aériennes dans les 3 conditions. Il est probable qu'en fonction du timing suivant l'exposition à l'environnement pro-allergique, les neutrophiles puissent se trouver dans l'interstitium lors de l'initiation de l'inflammation, et dans l'interstitium et la lumière des bronches par la suite. Ou encore,

les neutrophiles pourraient libérer des NETs suite à leur stimulation par des signaux de danger libérés par les cellules épithéliales ou les macrophages alvéolaires. Le LPS est reconnu par les cellules épithéliales et les cellules du système immunitaire inné par le TLR4 situé à la surface de ces cellules (Martin and Frevert, 2005). La liaison du LPS au TLR4 entraîne l'activation de la voie NF- κ B et la libération des cytokines IL-1, IL-6, TNF- α , IFNs de type I, IL-8 et MIP (Beutler and Rietschel, 2003). L'IL-1, l'IL-8 et le TNF- α peuvent induire la formation de NETs (Brinkmann et al., 2004; Keshari et al., 2012; Mitroulis et al., 2011). D'autre part, il a été démontré que le LPS pouvait médier l'autophagie en entrant en contact avec le TLR4 (Xu et al., 2007). Or, l'autophagie est un régulateur positif de la libération de NETs. L'induction directe des NETs par le LPS est un phénomène controversé (Liu et al., 2016), néanmoins les plaquettes activées par le LPS via le TLR4 présentent leur *High mobility group box 1* (HMGB1) aux neutrophiles et induisent la libération de NETs (Clark et al., 2007; Maugeri et al., 2014).

Le virus influenza, quant à lui, entre dans les cellules épithéliales où il initie son cycle de réplication et induit la sécrétion de plusieurs cytokines comme RANTES, MCP-1 et les IFNs de type I. Les cellules infectées sont ensuite phagocytées par les cellules du système immunitaire inné (macrophages, cellules NK, neutrophiles, CDs) et activent la synthèse de cytokines pro-inflammatoires comprenant l'IL-1 β et le TNF- α entre autres, qui pourraient à nouveau être responsables de l'induction de NETs. D'autre part, le virus influenza peut être endocyté et reconnu via le TLR7 par les neutrophiles (Wang et al., 2008). La voie de mort cellulaire des neutrophiles engagée par le virus influenza n'a pas été intensément investiguée, cependant, l'activation du TLR7 peut activer la nécroptose qui est observée au niveau des cellules épithéliales et CDs (Atkin-Smith et al., 2018). Or, la nécroptose peut conduire à la libération de NETs (Desai et al., 2017). Enfin, comme évoqué dans le paragraphe précédent, les IFNs de type I et l'IL-33 sont deux médiateurs libérés suite à l'exposition à chacun des environnements pro-allergiques (Kubala et al., 2014; Le Goffic et al., 2011; Shin et al., 2015) et peuvent favoriser l'induction des NETs (Gul et al., 2018; Yazdani et al., 2018).

L'ozone exerce ses effets dans un premier temps au niveau des cellules épithéliales pulmonaires et de leur couche de mucus. En effet, l'ozone ne traverse pas en tant que tel l'épithélium respiratoire (Kafoury et al., 1999). A ce niveau, les molécules d'ozone interagissent avec des acides gras mono-insaturés et poly-insaturés du mucus ou de la membrane plasmique des cellules épithéliales. Ces phénomènes conduisent à la libération de produits dérivés tels que des écosanoïdes, l'hydroxyperoxyde, des aldéhydes, des ozonides capables d'activer les cellules épithéliales et les macrophages alvéolaires (Kafoury et al., 2007; Pulfer and Murphy, 2004). Notamment, le recrutement de neutrophiles, la synthèse d'IL-6 ainsi que l'hyperréactivité bronchique induits par l'ozone dépendent également du TLR4, du TLR2, de MyD88 et de la voie de NF- κ B (Li et al., 2011; Williams et al., 2007). L'ozone fragmente l'acide hyaluronique de haut poids moléculaire de la matrice extracellulaire en composés de plus faible

poids moléculaire capables d'être reconnus par le TLR4 (Al-Hegelan et al., 2011). *In fine*, une exposition à l'ozone entraîne la libération de différents produits pro-inflammatoires dont la fibronectine, l'élastase, l'IL-1, le TNF- α , l'IL-6, l'IL-8 et le GM-CSF (Hollingsworth et al., 2007). Parmi ces produits, l'IL-1 (Mitroulis et al., 2011), le TNF- α et l'IL-8 (Keshari et al., 2012) sont de puissants inducteurs de NETs.

Nous avons démontré *in vivo* qu'une exposition aux trois environnements pro-allergiques entraînait une augmentation du nombre de moDCs ayant internalisé l'allergène, à savoir, les extraits d'acariens ou HDM. Cette augmentation est significativement inhibée lorsque les NETs sont inhibés ou dégradés. Dans des expériences de co-culture de BMDCs pulsées à l'aide d'extraits d'acariens couplés à des molécules fluorescentes avec des neutrophiles pro-allergiques dérivés de souris exposées à de faibles doses de LPS, nous avons observé une augmentation significative de l'internalisation de l'allergène par les CD⁺MHCII⁺CD11c⁺CD11b⁺Ly-6C⁺ ainsi qu'une augmentation de leur expression de CD86 en comparaison aux BMDCs contrôles ou co-cultivées avec les neutrophiles de souris exposées à de fortes doses de LPS. Cependant, seule l'internalisation de l'allergène par les BMDCs co-cultivées avec les neutrophiles pro-allergiques était significativement diminuée lorsque de la DNase était ajoutée au milieu de culture, alors que l'expression de CD86 n'était pas altérée. Ces données suggèrent que si la capture de l'allergène est bien médiée par les NETs, l'augmentation de CD86, en revanche, pourrait dépendre d'un autre facteur dérivé des neutrophiles. Ceci est en accord avec les études de Sangaletti et Barrientos. En effet, des NETs induits *in vivo* et collectés via une technique d'implants sous-cutanés sont capables de transférer l'allergène à des CD⁺ *ex vivo* (Sangaletti et al., 2012). Ces CD⁺ sont ensuite suffisantes pour induire le SLE lorsqu'elles sont transférées à des souris naïves (Sangaletti et al., 2012). De plus, Barrientos et collègues ont montré qu'une co-culture entre des NETs et des moDCs stimulées au LPS diminuait leur synthèse des cytokines IL-6, IL-12, IL-23 et TNF- α mais accroissait leur capacité de polarisation de lymphocytes T naïfs en lymphocytes Th2 (Barrientos et al., 2014). D'autre part, les neutrophiles peuvent induire une augmentation de l'expression de CD86 au niveau des CD⁺ via des mécanismes dépendant d'une interaction directe entre CD18-CEACAM au niveau des neutrophiles et DC-SIGN au niveau des CD⁺ (Gisbergen et al., 2005a, 2005b; Megiovanni et al., 2006), un mécanisme qui est donc indépendant des NETs.

Les trois environnements pro-allergiques induisent la formation de NETs dans le poumon, contrairement aux hautes doses de LPS. Le mécanisme responsable de l'absence de NETs lors de l'injection par voie intranasale de hautes doses de LPS n'est pas encore élucidé. Cependant, sur base de la littérature, trois hypothèses différentes peuvent être avancées. D'abord, Schuijs et collègues ont réalisé une étude focalisée sur le mécanisme impliqué dans l'effet protecteur de hautes doses de LPS administrées au niveau des voies respiratoires. Dans cette étude, les auteurs ont démontré qu'une haute dose de LPS ou plusieurs doses plus faibles mais administrées de manière chronique induisaient l'expression de la protéine A20 par les cellules épithéliales (Schuijs et al., 2015). A20 possède des

activités E3 ubiquitine ligase et de déubiquitinase (Catrysse et al., 2014) et a pour propriété de réguler négativement la voie de signalisation de NF- κ B et de diminuer la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires en aval de cette voie, telles que l'IL-1 α et le GM-CSF (Schuijs et al., 2015). Ces cytokines, sécrétées aux faibles doses de LPS, peuvent potentialiser la libération de NETs (Keshari et al., 2012; Saitoh et al., 2012), et leur inhibition suite à une exposition à de fortes doses de LPS et l'expression subséquente de A20 pourrait expliquer une absence de NETs aux fortes doses de LPS. Ensuite, dans notre laboratoire, nous avons démontré qu'une exposition à des produits dérivés de bactéries, l'ADN riche en motifs CpG en particulier, provoquait une expansion de Mregs au niveau des poumons, capables de délivrer une quantité importante d'IL-10 dans leur environnement direct (Sabatel et al., 2017). Or, la formation de NETs peut être entravée en présence d'IL-10 *in vitro* (Saitoh et al., 2012). Enfin, la taille des agents pathogènes peut déterminer l'initiation de la phagocytose ou de la libération de NETs, deux phénomènes antagonistes. La taille des agents pathogènes peut être évaluée par la cellule via l'interaction avec le récepteur dectine-1, et engager ainsi la phagocytose (Branzk et al., 2014). Si des organismes de taille trop importante pour être phagocytés induisent préférentiellement les NETs en l'absence d'interaction avec dectine-1, nous pourrions envisager pareil scénario pour des organismes ou molécules trop petits pour être phagocytés. Le LPS est un agent lipophile et peut former des micelles ou des agrégats lorsqu'il est dans un milieu hydrophile. Les faibles doses de LPS (100 ng) se situent en-dessous de la concentration micellaire critique de 10 μ g/ml (Bergstrand et al., 2006) et pourraient donc ne pas entraîner la phagocytose et induire des NETs par défaut, tandis que les fortes doses de LPS (200 μ g/ml), se situant au-dessus de la concentration micellaire critique, peuvent former des agrégats, voire des groupements d'agrégats pouvant atteindre en moyenne 320nm \pm 40nm de rayon (Bello et al., 2015; Bergstrand et al., 2006), et donc atteindre largement la taille minimale requise pour la phagocytose de 0.5 μ m (Stuart and Ezekowitz, 2005), inhibant ainsi la formation de NETs.

Afin de déterminer la contribution des NETs dans nos modèles, nous avons utilisé deux inhibiteurs de la formation des NETs : la Cl-amidine, un inhibiteur de l'enzyme PAD4, ainsi qu'un inhibiteur de la NE. De plus, nous avons utilisé un agent capable de dégrader les NETs une fois libérés dans le milieu extracellulaire: la DNase. L'avantage de ces approches réside dans le caractère aigu de l'inhibition des NETs, évitant ainsi des compensations ou des modifications importantes de longue durée, comme celles qui peuvent être observées chez les souris génétiquement modifiées. Il est donc important de pouvoir les inhiber pendant une période de temps contrôlée au cours de laquelle la libération de NETs a été identifiée. L'inconvénient principal repose cependant sur le fait qu'aucun de ces trois inhibiteurs n'est exclusivement spécifique, et aucun n'inhibe totalement la formation des NETs. En effet, PAD4 est également impliqué dans la prolifération des cellules hématopoïétiques pluripotentes (Nakashima et al., 2013). La NE a d'importantes fonctions microbicides indépendantes des NETs (Ribeiro-Gomes et al., 2007) et peut également jouer un rôle dans la régulation de certaines autres protéines comme la cathepsine G et la MMP-2 (Geraghty et al., 2007). De plus, des exemples de NETs

formés indépendamment de PAD4 (Díaz-Godínez et al., 2018; Guiducci et al., 2018) ou de NE (Martinod et al., 2016) ont été rapportés. Dans notre étude, nous avons cependant montré dans le modèle d'hygiène que la présence de NETs était significativement diminuée dans les souris traitées par chacun des trois inhibiteurs (figure sup 6). Enfin, la DNase peut contenir des protéases capables de dégrader non seulement les NETs mais aussi l'allergène administré (Noges et al., 2016). Néanmoins, dans nos modèles, la DNase n'est jamais administrée en même temps que l'allergène ni via la même voie (le HDM est administré par voie intranasale et la DNase en intrapéritonéal), réduisant ainsi les risques de dégradation directe de l'allergène par les protéases présentes dans la DNase. L'utilisation des trois inhibiteurs aboutit globalement à la même réponse, à savoir, l'inhibition de la réponse Th2 à l'encontre du HDM et des caractéristiques majeures de l'asthme allergique. Au vu de ces résultats, nous pouvons conclure que la libération des NETs dans nos trois modèles est dépendante de PAD4 et de NE, et que les effets favorisant la sensibilisation allergique reposent principalement sur les NETs et non un autre facteur. La diminution incomplète et parfois non-significative de certains paramètres, comme l'IL-4 chez les souris traitées à la DNase et l'IL-13 chez les souris traitées aux inhibiteurs de NE dans le modèle d'hygiène ou l'IL-13 chez les souris traitées à la DNase dans le modèle PR8 pourrait être expliquée par l'absence d'inhibition complète des NETs par les différents inhibiteurs. De plus, d'autres cellules peuvent être la source de ces cytokines et ce indépendamment de la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative. Par exemple, les ILC2s du poumon peuvent, en réponse à une infection au virus influenza, induire une hyperréactivité bronchique via la sécrétion d'IL-13 (Chang et al., 2011) et ces ILC2 sont également capables de migrer dans le ganglion lymphatique drainant (Dutton et al., 2019).

La question de l'existence de tels neutrophiles chez l'homme et de leur rôle dans l'induction de la sensibilisation allergique reste ouverte. Néanmoins, plusieurs évidences suggèrent la présence de neutrophiles aux propriétés similaires chez l'homme. Tout d'abord, dans une étude comparant les Amish et les Hutterite, deux populations d'agriculteurs américains partageant la même origine mais vivant dans des milieux totalement différents en terme de taux d'exposition au LPS, Stein et collègues ont caractérisé les cellules immunitaires innées de ces deux communautés. Parmi d'autres modifications, les auteurs ont observé une augmentation de l'expression de CXCR4 à la surface des neutrophiles sanguins des Hutterite, exposés à de faibles doses de LPS et montrant une prévalence d'asthme allergique importante en comparaison à ceux des Amish, exposés à un haut taux de LPS et protégés contre l'asthme allergique (Stein et al., 2016). Cette observation correspond au phénotype des neutrophiles induits par de faibles doses de LPS dans notre modèle « hygiénique ». Si les neutrophiles retrouvés chez les Amish et dans notre modèle murin partagent une forte expression de CXCR4, ils se situent néanmoins dans deux compartiments distincts. En effet, nous avons démontré que les neutrophiles pro-allergiques acquièrent leur phénotype particulier lors de leur entrée au niveau du poumon et n'avons observé aucune différence de l'expression de CXCR4 au niveau des neutrophiles sanguins et de la moelle osseuse, or, les neutrophiles CXCR4^{hi} des Amish ont été identifiés dans le sang dans l'étude de Stein. Nous n'avons, à

ce jour, pas d'explication à apporter à cette observation. Une explication pourrait être que lors d'une exposition chronique à un environnement particulier, les modifications pulmonaires pourraient être étendues au compartiment sanguin. Ensuite, une augmentation du nombre de neutrophiles exprimant l'intégrine CD49d a été observée au niveau d'échantillons sanguins et de lavages nasaux de patients asthmatiques allergiques en comparaison à des patients souffrant d'asthme non-atopique (Sigua et al., 2014). Enfin, Toussaint et collègues ont montré que lors d'exacerbations d'asthme allergique pré-existant induit par le RV chez l'homme, les neutrophiles recrutés dans le poumon libéraient des NETs et que la quantité de NE présente dans le lavage nasale corrélait avec la quantité de cytokine Th2 et la sévérité des symptômes de la crise d'exacerbation (Toussaint et al., 2017). Par ailleurs, l'étude de Bonnelykke révèle que le nombre d'épisodes infectieux expérimentés au cours de la petite enfance influence principalement l'induction de l'asthme allergique. Suite à l'obtention de ces résultats, les auteurs proposent l'implication d'un facteur dérivé de l'hôte, comme par exemple les NETs, plutôt qu'un pathogène précis comme facteur de risque majeur de l'asthme allergique (Bønnelykke et al., 2015). Ces études mettent en lumière la présence de neutrophiles particuliers partageant des caractéristiques communes avec nos neutrophiles chez des individus exposés à un environnement pro-allergique ou souffrant d'asthme allergique et une corrélation entre les NETs et l'activation d'une réponse immunitaire adaptative Th2.

En conclusion, nous avons démontré comment des environnements pro-allergiques, en apparence sans relation les uns avec les autres, façonnent le système immunitaire inné, en induisant un phénotype particulier au niveau des neutrophiles pulmonaires, pour favoriser la sensibilisation allergique et le développement de réponses allergiques de type Th2. Il reste cependant de nombreuses questions en relation avec ce phénomène et la biologie des neutrophiles au niveau du poumon.

Dans la suite du projet, nous aimerions dans un premier temps investiguer le rôle des neutrophiles induits par de hautes doses de LPS. En effet, les résultats préliminaires suggèrent un rôle régulateur de ces cellules. Les hautes doses de LPS sont associées à un effet protecteur contre le développement de l'asthme allergique, ces neutrophiles particuliers, recrutés en grand nombre dans le poumon suite à une exposition à de fortes doses de LPS pourraient contribuer à l'effet protecteur des hautes doses de LPS. Aussi, l'identification des signaux libérés par l'environnement pulmonaire, lors de l'exposition à des facteurs de risque de développement de l'asthme allergique, responsables de l'acquisition du phénotype des neutrophiles pro-allergiques pourrait s'avérer très utile dans le développement d'outils thérapeutiques. En effet, les neutrophiles pouvant remplir différentes fonctions, il est devenu évident que si l'inhibition de certains d'entre eux pourrait améliorer certaines conditions pathologiques, d'autres devraient au contraire être favorisés pour jouer des fonctions de régulation et de réparation tissulaire.

Bibliographie

Abbey D E, Mills P K, Petersen F F, and Beeson W L (1991). Long-term ambient concentrations of total suspended particulates and oxidants as related to incidence of chronic disease in California Seventh-Day Adventists. *Environ. Health Perspect.* 94, 43–50.

Abi Abdallah, D.S., Egan, C.E., Butcher, B.A., and Denkers, E.Y. (2011). Mouse neutrophils are professional antigen-presenting cells programmed to instruct Th1 and Th17 T-cell differentiation. *Int. Immunol.* 23, 317–326.

Adler, A., Tager, I., and Quintero, D.R. (2005). Decreased prevalence of asthma among farm-reared children compared with those who are rural but not farm-reared. *J. Allergy Clin. Immunol.* 115, 67–73.

Adrover, J.M., Nicolás-Ávila, J.A., and Hidalgo, A. (2016). Aging: A Temporal Dimension for Neutrophils. *Trends Immunol.* 37, 334–345.

Aherne, C.M., Saeedi, B., Collins, C.B., Masterson, J.C., McNamee, E.N., Perrenoud, L., Rapp, C.R., Curtis, V.F., Bayless, A., Fletcher, A., et al. (2015). Epithelial-specific A2B adenosine receptor signaling protects the colonic epithelial barrier during acute colitis. *Mucosal Immunol.* 8, 1324–1338.

Akbari, O., DeKruyff, R.H., and Umetsu, D.T. (2001). Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat. Immunol.* 2, 725–731.

Akbari, O., Stock, P., Meyer, E., Kronenberg, M., Sidobre, S., Nakayama, T., Taniguchi, M., Grusby, M.J., DeKruyff, R.H., and Umetsu, D.T. (2003). Essential role of NKT cells producing IL-4 and IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat. Med.* 9, 582–588.

Alexis, N.E., and Carlsten, C. (2014). Interplay of air pollution and asthma immunopathogenesis: a focused review of diesel exhaust and ozone. *Int. Immunopharmacol.* 23, 347–355.

Al-Garawi, A., Fattouh, R., Botelho, F., Walker, T.D., Goncharova, S., Moore, C.-L., Mori, M., Erjefalt, J.S., Chu, D.K., Humbles, A.A., et al. (2011). Influenza A facilitates sensitization to house dust mite in infant mice leading to an asthma phenotype in adulthood. *Mucosal Immunol.* 4, 682–694.

Al-Garawi, A.A., Fattouh, R., Walker, T.D., Jamula, E.B., Botelho, F., Goncharova, S., Reed, J., Stampfli, M.R., O’Byrne, P.M., Coyle, A.J., et al. (2009). Acute, but Not Resolved, Influenza A Infection Enhances Susceptibility to House Dust Mite-Induced Allergic Disease. *J. Immunol.* 182, 3095–3104.

Al-Hegelan, M., Tighe, R.M., Castillo, C., and Hollingsworth, J.W. (2011). Ambient ozone and pulmonary innate immunity. *Immunol. Res.* 49, 173–191.

Ali, S.R., Fong, J.J., Carlin, A.F., Busch, T.D., Linden, R., Angata, T., Areschoug, T., Parast, M., Varki, N., Murray, J., et al. (2014). Siglec-5 and Siglec-14 are polymorphic paired receptors that modulate neutrophil and amnion signaling responses to group B Streptococcus. *J. Exp. Med.* 211, 1231–1242.

Almansa, R., Anton, A., Ramirez, P., Martin-Loeches, I., Banner, D., Pumarola, T., Xu, L., Blanco, J., Ran, L., Lopez-Campos, G., et al. (2011). Direct association between pharyngeal viral secretion and host cytokine response in severe pandemic influenza. *BMC Infect. Dis.* 11, 232.

Al-Muhsen, S., Johnson, J.R., and Hamid, Q. (2011). Remodeling in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 128, 451–462.

Alphonse, M.P., Saffar, A.S., Shan, L., HayGlass, K.T., Simons, F.E.R., and Gounni, A.S. (2008). Regulation of the High Affinity IgE Receptor (FcεRI) in Human Neutrophils: Role of Seasonal Allergen Exposure and Th-2 Cytokines. *PLOS ONE* 3, e1921.

Amirbeagi Firoozeh, Thulin Pontus, Pullerits Rille, Pedersen Bo, Andersson Bengt A., Dahlgren Claes, Welin Amanda, and Bylund Johan (2014). Olfactomedin-4 autoantibodies give unusual c-ANCA staining patterns with reactivity to a subpopulation of neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 97, 181–189.

Amsen, D., Blander, J.M., Lee, G.R., Tanigaki, K., Honjo, T., and Flavell, R.A. (2004). Instruction of Distinct CD4 T Helper Cell Fates by Different Notch Ligands on Antigen-Presenting Cells. *Cell* 117, 515–526.

Anand, S., and Mande, S.S. (2018). Diet, Microbiota and Gut-Lung Connection. *Front. Microbiol.* 9.

Anderson, H.M., Lemanske, R.F., Evans, M.D., Gangnon, R.E., Pappas, T., Grindle, K., Bochkov, Y.A., Gern, J.E., and Jackson, D.J. (2017). Assessment of wheezing frequency and viral etiology on childhood and adolescent asthma risk. *J. Allergy Clin. Immunol.* 139, 692–694.

Andzinski, L., Kasnitz, N., Stahnke, S., Wu, C.-F., Gereke, M., Köckritz-Blickwede, M. von, Schilling, B., Brandau, S., Weiss, S., and Jablonska, J. (2016). Type I IFNs induce anti-tumor polarization of tumor associated neutrophils in mice and human. *Int. J. Cancer* 138, 1982–1993.

- Annane, D., Bellissant, E., and Cavaillon, J.-M. (2005). Septic shock. *The Lancet* 365, 63–78.
- Arias, C.F., Escalera-Zamudio, M., de los Dolores Soto-Del Río, M., Georgina Cobián-Güemes, A., Isa, P., and López, S. (2009). Molecular Anatomy of 2009 Influenza Virus A (H1N1). *Arch. Med. Res.* 40, 643–654.
- Arpaia, N., Campbell, C., Fan, X., Dikiy, S., van der Veeke, J., deRoos, P., Liu, H., Cross, J.R., Pfeffer, K., Coffey, P.J., et al. (2013). Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature* 504, 451–455.
- Atkin-Smith, G.K., Duan, M., Chen, W., and Poon, I.K.H. (2018). The induction and consequences of Influenza A virus-induced cell death. *Cell Death Dis.* 9, 1–11.
- Averhoff, P., Kolbe, M., Zychlinsky, A., and Weinrauch, Y. (2008). Single Residue Determines the Specificity of Neutrophil Elastase for *Shigella* Virulence Factors. *J. Mol. Biol.* 377, 1053–1066.
- Bacher, P., Heinrich, F., Stervbo, U., Nienen, M., Vahldieck, M., Iwert, C., Vogt, K., Kollet, J., Babel, N., Sawitzki, B., et al. (2016). Regulatory T Cell Specificity Directs Tolerance versus Allergy against Aeroantigens in Humans. *Cell* 167, 1067–1078.e16.
- Barnes, P.J. (2011). Pathophysiology of allergic inflammation. *Immunol. Rev.* 242, 31–50.
- Barrientos, L., Bignon, A., Gueguen, C., Chaisemartin, L. de, Gorges, R., Sandré, C., Mascarell, L., Balabanian, K., Kerdine-Römer, S., Pallardy, M., et al. (2014). Neutrophil Extracellular Traps Downregulate Lipopolysaccharide-Induced Activation of Monocyte-Derived Dendritic Cells. *J. Immunol.* 193, 5689–5698.
- Bartlett, N.W., Walton, R.P., Edwards, M.R., Aniscenko, J., Caramori, G., Zhu, J., Glanville, N., Choy, K.J., Jourdan, P., Burnet, J., et al. (2008). Mouse models of rhinovirus-induced disease and exacerbation of allergic airway inflammation. *Nat. Med.* 14, 199–204.
- Bartlett, N.W., Singanayagam, A., and Johnston, S.L. (2015). Mouse models of rhinovirus infection and airways disease. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1221, 181–188.
- Beauvillain, C., Delneste, Y., Scotet, M., Peres, A., Gascan, H., Guernonprez, P., Barnaba, V., and Jeannin, P. (2007). Neutrophils efficiently cross-prime naive T cells in vivo. *Blood* 110, 2965–2973.

Beauvillain, C., Cunin, P., Doni, A., Scotet, M., Jaillon, S., Loiry, M.-L., Magistrelli, G., Masternak, K., Chevailler, A., Delneste, Y., et al. (2011). CCR7 is involved in the migration of neutrophils to lymph nodes. *Blood* 117, 1196–1204.

Bedoret, D., Wallemacq, H., Marichal, T., Desmet, C., Calvo, F.Q., Henry, E., Closset, R., Dewals, B., Thielen, C., Gustin, P., et al. (2009). Lung interstitial macrophages alter dendritic cell functions to prevent airway allergy in mice. *J. Clin. Invest.* 119, 3723–3738.

Behnen, M., Leschczyk, C., Möller, S., Batel, T., Klinger, M., Solbach, W., and Laskay, T. (2014). Immobilized Immune Complexes Induce Neutrophil Extracellular Trap Release by Human Neutrophil Granulocytes via FcγRIIIB and Mac-1. *J. Immunol.* 193, 1954–1965.

Beigelman, A., and Bacharier, L.B. (2013). The role of early life viral bronchiolitis in the inception of asthma. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 13, 211–216.

Bello, G., Eriksson, J., Terry, A., Edwards, K., Lawrence, M.J., Barlow, D., and Harvey, R.D. (2015). Characterization of the Aggregates Formed by Various Bacterial Lipopolysaccharides in Solution and upon Interaction with Antimicrobial Peptides. *Langmuir* 31, 741–751.

Bergstrand, A., Svanberg, C., Langton, M., and Nydén, M. (2006). Aggregation behavior and size of lipopolysaccharide from *Escherichia coli* O55:B5. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 53, 9–14.

Besnard, A.-G., Togbe, D., Guillou, N., Erard, F., Quesniaux, V., and Ryffel, B. (2011). IL-33-activated dendritic cells are critical for allergic airway inflammation. *Eur. J. Immunol.* 41, 1675–1686.

Bettiol J., Radermecker M., Sele J., Henquet M., Cataldo D., and Louis R. (2001). Airway mast-cell activation in asthmatics is associated with selective sputum eosinophilia. *Allergy* 54, 1188–1193.

Beutler, B., and Rietschel, E.T. (2003). Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 169–176.

Bianchi, M., Niemiec, M.J., Siler, U., Urban, C.F., and Reichenbach, J. (2011). Restoration of anti-*Aspergillus* defense by neutrophil extracellular traps in human chronic granulomatous disease after gene therapy is calprotectin-dependent. *J. Allergy Clin. Immunol.* 127, 1243-1252.e7.

Biernacki, W.A., Kharitonov, S.A., and Barnes, P.J. (2003). Increased leukotriene B4 and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of patients with exacerbations of COPD. *Thorax* 58, 294–298.

van den Biggelaar, A.H., van Ree, R., Rodrigues, L.C., Lell, B., Deelder, A.M., Kremsner, P.G., and Yazdanbakhsh, M. (2000). Decreased atopy in children infected with *Schistosoma haematobium*: a role for parasite-induced interleukin-10. *The Lancet* 356, 1723–1727.

Bliss, S.K., Gavrilescu, L.C., Alcaraz, A., and Denkers, E.Y. (2001). Neutrophil Depletion during *Toxoplasma gondii* Infection Leads to Impaired Immunity and Lethal Systemic Pathology. *Infect. Immun.* 69, 4898–4905.

Boari, J.T., Vesely, M.C.A., Bermejo, D.A., Ramello, M.C., Montes, C.L., Cejas, H., Gruppi, A., and Rodríguez, E.V.A. (2012). IL-17RA Signaling Reduces Inflammation and Mortality during *Trypanosoma cruzi* Infection by Recruiting Suppressive IL-10-Producing Neutrophils. *PLOS Pathog.* 8, e1002658.

Bønnelykke, K., Vissing, N.H., Sevelsted, A., Johnston, S.L., and Bisgaard, H. (2015). Association between respiratory infections in early life and later asthma is independent of virus type. *J. Allergy Clin. Immunol.* 136, 81-86.e4.

Borregaard, N. (2010). Neutrophils, from Marrow to Microbes. *Immunity* 33, 657–670.

Bradley, L.M., Douglass, M.F., Chatterjee, D., Akira, S., and Baaten, B.J.G. (2012). Matrix Metalloprotease 9 Mediates Neutrophil Migration into the Airways in Response to Influenza Virus-Induced Toll-Like Receptor Signaling. *PLOS Pathog.* 8, e1002641.

Branzk, N., Lubojemska, A., Hardison, S.E., Wang, Q., Gutierrez, M.G., Brown, G.D., and Papayannopoulos, V. (2014). Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat. Immunol.* 15, 1017–1025.

Braun-Fahrlander, C., Gassner, M., Grize, L., Neu, U., Sennhauser, F.H., Varonier, H.S., Vuille, J.C., and Wüthrich, B. (1999). Prevalence of hay fever and allergic sensitization in farmer's children and their peers living in the same rural community. SCARPOL team. Swiss Study on Childhood Allergy and Respiratory Symptoms with Respect to Air Pollution. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* 29, 28–34.

Braun-Fahrlander, C., Riedler, J., Herz, U., Eder, W., Waser, M., Grize, L., Maisch, S., Carr, D., Gerlach, F., Bufe, A., et al. (2002). Environmental Exposure to Endotoxin and Its Relation to Asthma in School-Age Children. *N. Engl. J. Med.* 347, 869–877.

Brimnes, M.K., Bonifaz, L., Steinman, R.M., and Moran, T.M. (2003). Influenza Virus–induced Dendritic Cell Maturation Is Associated with the Induction of Strong T Cell Immunity to a Coadministered, Normally Nonimmunogenic Protein. *J. Exp. Med.* 198, 133–144.

Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D.S., Weinrauch, Y., and Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science* 303, 1532–1535.

Bui, T.M., Mascarenhas, L.A., and Sumagin, R. (2018). Extracellular vesicles regulate immune responses and cellular function in intestinal inflammation and repair. *Tissue Barriers* 6, e1431038.

Busse, W.W., and Rosenwasser, L.J. (2003). Mechanisms of asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111, S799–S804.

Busse, W.W., Lemanske, R.F., and Gern, J.E. (2010a). Role of viral respiratory infections in asthma and asthma exacerbations. *The Lancet* 376, 826–834.

Busse, W.W., Lemanske Jr, R.F., and Gern, J.E. (2010b). Role of viral respiratory infections in asthma and asthma exacerbations. *The Lancet* 376, 826–834.

Calderón, M.A., Linneberg, A., Kleine-Tebbe, J., De Blay, F., Hernandez Fernandez de Rojas, D., Virchow, J.C., and Demoly, P. (2015). Respiratory allergy caused by house dust mites: What do we really know? *J. Allergy Clin. Immunol.* 136, 38–48.

Campbell, E.L., Bruyninckx, W.J., Kelly, C.J., Glover, L.E., McNamee, E.N., Bowers, B.E., Bayless, A.J., Scully, M., Saeedi, B.J., Golden-Mason, L., et al. (2014). Transmigrating Neutrophils Shape the Mucosal Microenvironment through Localized Oxygen Depletion to Influence Resolution of Inflammation. *Immunity* 40, 66–77.

Carman, C.V., and Springer, T.A. (2004). A trans migratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. *J. Cell Biol.* 167, 377–388.

Carmona-Rivera, C., and Kaplan, M.J. (2013). Low-density granulocytes: a distinct class of neutrophils in systemic autoimmunity. *Semin. Immunopathol.* 35, 455–463.

Cataldo, D.D., Tournoy, K.G., Vermaelen, K., Munaut, C., Foidart, J.-M., Louis, R., Noël, A., and Pauwels, R.A. (2002). Matrix Metalloproteinase-9 Deficiency Impairs Cellular Infiltration and

Bronchial Hyperresponsiveness during Allergen-Induced Airway Inflammation. *Am. J. Pathol.* *161*, 491–498.

Catrysse, L., Vereecke, L., Beyaert, R., and van Loo, G. (2014). A20 in inflammation and autoimmunity. *Trends Immunol.* *35*, 22–31.

Cayrol, C., and Girard, J.-P. (2014). IL-33: an alarmin cytokine with crucial roles in innate immunity, inflammation and allergy. *Curr. Opin. Immunol.* *31*, 31–37.

Chang, Y.-C., Olson, J., Beasley, F.C., Tung, C., Zhang, J., Crocker, P.R., Varki, A., and Nizet, V. (2014). Group B Streptococcus Engages an Inhibitory Siglec through Sialic Acid Mimicry to Blunt Innate Immune and Inflammatory Responses In Vivo. *PLOS Pathog.* *10*, e1003846.

Chang, Y.-J., Kim, H.Y., Albacker, L.A., Baumgarth, N., McKenzie, A.N.J., Smith, D.E., DeKruyff, R.H., and Umetsu, D.T. (2011). Innate lymphoid cells mediate influenza-induced airway hyper-reactivity independently of adaptive immunity. *Nat. Immunol.* *12*, 631–638.

Charmoy, M., Hurrell, B.P., Romano, A., Lee, S.H., Ribeiro-Gomes, F., Riteau, N., Mayer-Barber, K., Tacchini-Cottier, F., and Sacks, D.L. (2016). The Nlrp3 inflammasome, IL-1 β , and neutrophil recruitment are required for susceptibility to a nonhealing strain of *Leishmania major* in C57BL/6 mice. *Eur. J. Immunol.* *46*, 897–911.

Chawes, B.L.K., Poorisrisak, P., Johnston, S.L., and Bisgaard, H. (2012). Neonatal bronchial hyperresponsiveness precedes acute severe viral bronchiolitis in infants. *J. Allergy Clin. Immunol.* *130*, 354–361.e3.

Cheung, D.S., Ehlenbach, S.J., Kitchens, R.T., Riley, D.A., Thomas, L.L., Holtzman, M.J., and Grayson, M.H. (2010). Cutting edge: CD49d⁺ neutrophils induce Fc ϵ sRI expression on lung dendritic cells in a mouse model of postviral asthma. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *185*, 4983–4987.

Christoffersson, G., Vågesjö, E., Vandooren, J., Lidén, M., Massena, S., Reinert, R.B., Brissova, M., Powers, A.C., Opdenakker, G., and Phillipson, M. (2012). VEGF-A recruits a proangiogenic MMP-9-delivering neutrophil subset that induces angiogenesis in transplanted hypoxic tissue. *Blood* *120*, 4653–4662.

Clark, S.R., Ma, A.C., Tavener, S.A., McDonald, B., Goodarzi, Z., Kelly, M.M., Patel, K.D., Chakrabarti, S., McAvoy, E., Sinclair, G.D., et al. (2007). Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat. Med.* *13*, 463–469.

Clemmensen Stine N., Bohr Christina T., Rørvig Sara, Glenthøj Andreas, Mora-Jensen Helena, Cramer Elisabeth P., Jacobsen Lars C., Larsen Maria T., Cowland Jack B., Tanassi Julia T., et al. (2011). Olfactomedin 4 defines a subset of human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 91, 495–500.

Colgan, S.P., Eltzschig, H.K., Eckle, T., and Thompson, L.F. (2006). Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signal.* 2, 351.

Cormier, S.A., You, D., and Honnegowda, S. (2010). The use of a neonatal mouse model to study respiratory syncytial virus infections. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 8, 1371–1380.

Cosentino, G., Soprana, E., Thienes, C.P., Siccardi, A.G., Viale, G., and Vercelli, D. (1995). IL-13 down-regulates CD14 expression and TNF-alpha secretion in normal human monocytes. *J. Immunol.* 155, 3145–3151.

Costantini, C., and Cassatella, M.A. (2011). The defensive alliance between neutrophils and NK cells as a novel arm of innate immunity. *J. Leukoc. Biol.* 89, 221–233.

Csepregi, J.Z., Orosz, A., Zajta, E., Kása, O., Németh, T., Simon, E., Fodor, S., Csonka, K., Barátki, B.L., Kövesdi, D., et al. (2018). Myeloid-Specific Deletion of Mcl-1 Yields Severely Neutropenic Mice That Survive and Breed in Homozygous Form. *J. Immunol.* 201, 3793–3803.

Csoma, Z., Kharitonov, S.A., Balint, B., Bush, A., Wilson, N.M., and Barnes, P.J. (2002). Increased Leukotrienes in Exhaled Breath Condensate in Childhood Asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166, 1345–1349.

Dahl, M.E., Dabbagh, K., Liggitt, D., Kim, S., and Lewis, D.B. (2004). Viral-induced T helper type 1 responses enhance allergic disease by effects on lung dendritic cells. *Nat. Immunol.* 5, 337–343.

Dale, D.C., Boxer, L., and Liles, W.C. (2008). The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood* 112, 935–945.

Daley, J.M., Thomay, A.A., Connolly, M.D., Reichner, J.S., and Albina, J.E. (2008). Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *J. Leukoc. Biol.* 83, 64–70.

Dalli, J., and Serhan, C.N. (2012). Specific lipid mediator signatures of human phagocytes: microparticles stimulate macrophage efferocytosis and pro-resolving mediators. *Blood* 120, e60–e72.

D'Amato, G., Liccardi, G., D'Amato, M., and Cazzola, M. (2002). Outdoor air pollution, climatic changes and allergic bronchial asthma. *Eur. Respir. J.* 20, 763–776.

De Kleer, I., Willems, F., Lambrecht, B., and Goriely, S. (2014). Ontogeny of Myeloid Cells. *Front. Immunol.* 5.

Debarry, J., Garn, H., Hanuszkiewicz, A., Dickgreber, N., Blümer, N., von Mutius, E., Bufer, A., Gattermann, S., Renz, H., Holst, O., et al. (2007). *Acinetobacter lwoffii* and *Lactococcus lactis* strains isolated from farm cowsheds possess strong allergy-protective properties. *J. Allergy Clin. Immunol.* 119, 1514–1521.

Delayre-Orthez, C., Blay, F.D., Frossard, N., and Pons, F. (2004). Dose-dependent effects of endotoxins on allergen sensitization and challenge in the mouse. *Clin. Exp. Allergy* 34, 1789–1795.

Deniset, J.F., and Kubes, P. (2018). Neutrophil heterogeneity: Bona fide subsets or polarization states? *J. Leukoc. Biol.* 103, 829–838.

Deniset, J.F., Surewaard, B.G., Lee, W.-Y., and Kubes, P. (2017). Splenic Ly6G^{high} mature and Ly6G^{int} immature neutrophils contribute to eradication of *S. pneumoniae*. *J. Exp. Med.* 214, 1333–1350.

Depuydt, P.O., Lambrecht, B.N., Joos, G.F., and Pauwels, R.A. (2002). Effect of ozone exposure on allergic sensitization and airway inflammation induced by dendritic cells. *Clin. Exp. Allergy* 32, 391–396.

Desai, J., Kumar, S.V., Mulay, S.R., Konrad, L., Romoli, S., Schauer, C., Herrmann, M., Bilyy, R., Müller, S., Popper, B., et al. (2016). PMA and crystal-induced neutrophil extracellular trap formation involves RIPK1–RIPK3–MLKL signaling. *Eur. J. Immunol.* 46, 223–229.

Desai, J., Foresto-Neto, O., Honarpisheh, M., Steiger, S., Nakazawa, D., Popper, B., Buhl, E.M., Boor, P., Mulay, S.R., and Anders, H.-J. (2017). Particles of different sizes and shapes induce neutrophil necroptosis followed by the release of neutrophil extracellular trap-like chromatin. *Sci. Rep.* 7, 1–10.

Devalaraja, R.M., Nanney, L.B., Qian, Q., Du, J., Yu, Y., Devalaraja, M.N., and Richmond, A. (2000). Delayed Wound Healing in CXCR2 Knockout Mice. *J. Invest. Dermatol.* 115, 234–244.

Díaz-Godínez, C., Fonseca, Z., Néquiz, M., Laclette, J.P., Rosales, C., and Carrero, J.C. (2018). *Entamoeba histolytica* Trophozoites Induce a Rapid Non-classical NETosis Mechanism Independent of NOX2-Derived Reactive Oxygen Species and PAD4 Activity. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8.

Doeing, D.C., Borowicz, J.L., and Crockett, E.T. (2003). Gender dimorphism in differential peripheral blood leukocyte counts in mice using cardiac, tail, foot, and saphenous vein puncture methods. *BMC Clin. Pathol.* 3, 3.

Doherty, T., and Broide, D. (2007). Cytokines and growth factors in airway remodeling in asthma. *Curr. Opin. Immunol.* 19, 676–680.

Dong, G.-H., Chen, T., Liu, M.-M., Wang, D., Ma, Y.-N., Ren, W.-H., Lee, Y.L., Zhao, Y.-D., and He, Q.-C. (2011). Gender Differences and Effect of Air Pollution on Asthma in Children with and without Allergic Predisposition: Northeast Chinese Children Health Study. *PLOS ONE* 6, e22470.

Douwes, J., Pearce, N., and Heederik, D. (2002). Does environmental endotoxin exposure prevent asthma? *Thorax* 57, 86–90.

Douwes, J., Travier, N., Huang, K., Cheng, S., McKenzie, J., Gros, G.L., Mutius, E.V., and Pearce, N. (2007). Lifelong farm exposure may strongly reduce the risk of asthma in adults. *Allergy* 62, 1158–1165.

Douwes, J., Cheng, S., Travier, N., Cohet, C., Niesink, A., McKenzie, J., Cunningham, C., Gros, G.L., Mutius, E. von, and Pearce, N. (2008). Farm exposure in utero may protect against asthma, hay fever and eczema. *Eur. Respir. J.* 32, 603–611.

Duffy, D., Perrin, H., Abadie, V., Benhabiles, N., Boissonnas, A., Liard, C., Descours, B., Reboulleau, D., Bonduelle, O., Verrier, B., et al. (2012). Neutrophils Transport Antigen from the Dermis to the Bone Marrow, Initiating a Source of Memory CD8⁺ T Cells. *Immunity* 37, 917–929.

Dutton, E.E., Gajdasik, D.W., Willis, C., Fiancette, R., Bishop, E.L., Camelo, A., Sleeman, M.A., Coccia, M., Didierlaurent, A.M., Tomura, M., et al. (2019). Peripheral lymph nodes contain migratory and resident innate lymphoid cell populations. *Sci. Immunol.* 4.

Dwyer, M., Shan, Q., D’Ortona, S., Maurer, R., Mitchell, R., Olesen, H., Thiel, S., Huebner, J., and Gadjeva, M. (2014). Cystic Fibrosis Sputum DNA Has NETosis Characteristics and Neutrophil Extracellular Trap Release Is Regulated by Macrophage Migration-Inhibitory Factor. *J. Innate Immun.* 6, 765–779.

Eash, K.J., Means, J.M., White, D.W., and Link, D.C. (2009). CXCR4 is a key regulator of neutrophil release from the bone marrow under basal and stress granulopoiesis conditions. *Blood* 113, 4711–4719.

Eash, K.J., Greenbaum, A.M., Gopalan, P.K., and Link, D.C. (2010). CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. *J. Clin. Invest.* 120, 2423–2431.

Easton, A., Haque, A., Chu, K., Lukaszewski, R., and Bancroft, G.J. (2007). A Critical Role for Neutrophils in Resistance to Experimental Infection with *Burkholderia pseudomallei*. *J. Infect. Dis.* 195, 99–107.

Eder, W., Ege, M.J., and von Mutius, E. (2006). The Asthma Epidemic. *N. Engl. J. Med.* 355, 2226–2235.

EDWARDS, S.W. (1994). The developmet and structure of mature neutrophils. *Biochem. Physiol. Neutrophil* 33–76.

Ege, M.J., Herzum, I., Büchele, G., Krauss-Etschmann, S., Lauener, R.P., Rojonen, M., Hyvärinen, A., Vuitton, D.A., Riedler, J., Brunekreef, B., et al. (2008). Prenatal exposure to a farm environment modifies atopic sensitization at birth. *J. Allergy Clin. Immunol.* 122, 407–412.e4.

Eisenbarth, S.C., Piggott, D.A., Huleatt, J.W., Visintin, I., Herrick, C.A., and Bottomly, K. (2002). Lipopolysaccharide-enhanced, Toll-like Receptor 4–dependent T Helper Cell Type 2 Responses to Inhaled Antigen. *J. Exp. Med.* 196, 1645–1651.

Eken, C., Gasser, O., Zenhausem, G., Oehri, I., Hess, C., and Schifferli, J.A. (2008). Polymorphonuclear Neutrophil-Derived Ectosomes Interfere with the Maturation of Monocyte-Derived Dendritic Cells. *J. Immunol.* 180, 817–824.

Ekpenyong, A.E., Toepfner, N., Fiddler, C., Herbig, M., Li, W., Cojoc, G., Summers, C., Guck, J., and Chilvers, E.R. (2017). Mechanical deformation induces depolarization of neutrophils. *Sci. Adv.* 3, e1602536.

Elliott, M.R., Koster, K.M., and Murphy, P.S. (2017). Efferocytosis Signaling in the Regulation of Macrophage Inflammatory Responses. *J. Immunol.* 198, 1387–1394.

Erridge, C., Bennett-Guerrero, E., and Poxton, I.R. (2002). Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes Infect.* 4, 837–851.

Evans, D.J., Barnes, P.J., Spaethe, S.M., Alstyne, E.L. van, Mitchell, M.I., and O'Connor, B.J. (1996). Effect of a leukotriene B4 receptor antagonist, LY293111, on allergen induced responses in asthma. *Thorax* 51, 1178–1184.

Evrard, M., Kwok, I.W.H., Chong, S.Z., Teng, K.W.W., Becht, E., Chen, J., Sieow, J.L., Penny, H.L., Ching, G.C., Devi, S., et al. (2018). Developmental Analysis of Bone Marrow Neutrophils Reveals Populations Specialized in Expansion, Trafficking, and Effector Functions. *Immunity* 48, 364-379.e8.

Farrera, C., and Fadeel, B. (2013). Macrophage Clearance of Neutrophil Extracellular Traps Is a Silent Process. *J. Immunol.* 191, 2647–2656.

Faurschou, M., and Borregaard, N. (2003). Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect.* 5, 1317–1327.

Feldmesser, M. (2006). Role of Neutrophils in Invasive Aspergillosis ▽. *Infect. Immun.* 74, 6514–6516.

Filì, L., Ferri, S., Guarna, F., Sampognaro, S., Manuelli, C., Liotta, F., Cosmi, L., Matucci, A., Vultaggio, A., Annunziato, F., et al. (2006). Redirection of allergen-specific TH2 responses by a modified adenine through Toll-like receptor 7 interaction and IL-12/IFN release. *J. Allergy Clin. Immunol.* 118, 511–517.

Finkelman, F.D., Hogan, S.P., Hershey, G.K.K., Rothenberg, M.E., and Wills-Karp, M. (2010). Importance of cytokines in murine allergic airway disease and human asthma. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 184, 1663–1674.

Finkelman, M.A., Lempitski, S.J., and Slater, J.E. (2006). β -Glucans in standardized allergen extracts. *J. Endotoxin Res.* 12, 241–245.

Fishbein, A.B., and Fuleihan, R.L. (2012). The hygiene hypothesis revisited: does exposure to infectious agents protect us from allergy? *Curr. Opin. Pediatr.* 24, 98.

Fleming, T.J., Fleming, M.L., and Malek, T.R. (1993). Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family. *J. Immunol.* 151, 2399–2408.

Fritz, D.K., Kerr, C., Fattouh, R., Llop-Guevara, A., Khan, W.I., Jordana, M., and Richards, C.D. (2011). A Mouse Model of Airway Disease: Oncostatin M-Induced Pulmonary Eosinophilia,

Goblet Cell Hyperplasia, and Airway Hyperresponsiveness Are STAT6 Dependent, and Interstitial Pulmonary Fibrosis Is STAT6 Independent. *J. Immunol.* 186, 1107–1118.

Fuchs, T.A., Brill, A., Duerschmied, D., Schatzberg, D., Monestier, M., Myers, D.D., Wroblewski, S.K., Wakefield, T.W., Hartwig, J.H., and Wagner, D.D. (2010). Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 15880–15885.

Fujisawa, H. (2001). Inhibitory Role of Neutrophils on Influenza Virus Multiplication in the Lungs of Mice. *Microbiol. Immunol.* 45, 679–688.

Fukuyama, S., and Kawaoka, Y. (2011). The pathogenesis of influenza virus infections: the contributions of virus and host factors. *Curr. Opin. Immunol.* 23, 481–486.

Galli, S.J., and Tsai, M. (2012). IgE and mast cells in allergic disease. *Nat. Med.* 18, 693–704.

Galli, S.J., Tsai, M., and Piliponsky, A.M. (2008). The development of allergic inflammation. *Nature* 454, 445–454.

Gasser, O., and Schifferli, J.A. (2004). Activated polymorphonuclear neutrophils disseminate anti-inflammatory microparticles by ectocytosis. *Blood* 104, 2543–2548.

Gavala, M.L., Bertics, P.J., and Gern, J.E. (2011). Rhinoviruses, allergic inflammation, and asthma. *Immunol. Rev.* 242, 69–90.

Ge, L., Zhou, X., Ji, W.-J., Lu, R.-Y., Zhang, Y., Zhang, Y.-D., Ma, Y.-Q., Zhao, J.-H., and Li, Y.-M. (2014). Neutrophil extracellular traps in ischemia-reperfusion injury-induced myocardial no-reflow: therapeutic potential of DNase-based reperfusion strategy. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 308, H500–H509.

Gehring, U., Bolte, G., Borte, M., Bischof, W., Fahlbusch, B., Wichmann, H.-E., and Heinrich, J. (2001). Exposure to endotoxin decreases the risk of atopic eczema in infancy: A cohort study. *J. Allergy Clin. Immunol.* 108, 847–854.

Gehring, U., Bischof, W., Fahlbusch, B., Wichmann, H.-E., and Heinrich, J. (2002). House Dust Endotoxin and Allergic Sensitization in Children. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166, 939–944.

Genuneit, J., Strachan, D.P., Büchele, G., Weber, J., Loss, G., Sozanska, B., Boznanski, A., Horak, E., Heederik, D., Braun-Fahrlander, C., et al. (2013). The combined effects of family size and farm exposure on childhood hay fever and atopy. *Pediatr. Allergy Immunol.* 24, 293–298.

Geraghty, P., Rogan, M.P., Greene, C.M., Boxio, R.M.M., Poiriert, T., O'Mahony, M., Belaaouaj, A., O'Neill, S.J., Taggart, C.C., and McElvaney, N.G. (2007). Neutrophil Elastase Up-Regulates Cathepsin B and Matrix Metalloprotease-2 Expression. *J. Immunol.* 178, 5871–5878.

Gillis, C.M., and Reber, L.L. (2018). [PMNDTR mice: a new model to study neutrophils in vivo]. *Med. Sci. MS* 34, 339–343.

Girbl, T., Lenn, T., Perez, L., Rolas, L., Barkaway, A., Thiriot, A., del Fresno, C., Lynam, E., Hub, E., Thelen, M., et al. (2018). Distinct Compartmentalization of the Chemokines CXCL1 and CXCL2 and the Atypical Receptor ACKR1 Determine Discrete Stages of Neutrophil Diapedesis. *Immunity* 49, 1062-1076.e6.

Gisbergen, K.P.J.M. van, Ludwig, I.S., Geijtenbeek, T.B.H., and Kooyk, Y. van (2005a). Interactions of DC-SIGN with Mac-1 and CEACAM1 regulate contact between dendritic cells and neutrophils. *FEBS Lett.* 579, 6159–6168.

Gisbergen, K.P.J.M. van, Sanchez-Hernandez, M., Geijtenbeek, T.B.H., and Kooyk, Y. van (2005b). Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN. *J. Exp. Med.* 201, 1281–1292.

Gobbetti, T., Coldewey, S.M., Chen, J., McArthur, S., Faouder, P. le, Cenac, N., Flower, R.J., Thiemermann, C., and Perretti, M. (2014). Nonredundant protective properties of FPR2/ALX in polymicrobial murine sepsis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 18685–18690.

Gounni, A.S., Lamkhioed, B., Koussih, L., Ra, C., Renzi, P.M., and Hamid, Q. (2001). Human neutrophils express the high-affinity receptor for immunoglobulin E (FcεRI): role in asthma. *FASEB J.* 15, 940–949.

Grainger, J.R., Smith, K.A., Hewitson, J.P., McSorley, H.J., Harcus, Y., Filbey, K.J., Finney, C.A.M., Greenwood, E.J.D., Knox, D.P., Wilson, M.S., et al. (2010). Helminth secretions induce de novo T cell Foxp3 expression and regulatory function through the TGF-β pathway. *J. Exp. Med.* 207, 2331–2341.

Greer, J.R., Abbey, D.E., and Burchette, R.J. (1993). Asthma related to occupational and ambient air pollutants in nonsmokers. *J. Occup. Med. Off. Publ. Ind. Med. Assoc.* 35, 909–915.

Gregory, L.G., and Lloyd, C.M. (2011). Orchestrating house dust mite-associated allergy in the lung. *Trends Immunol.* 32, 402–411.

- Guarnieri, M., and Balmes, J.R. (2014). Outdoor air pollution and asthma. *The Lancet* 383, 1581–1592.
- Guiducci, E., Lemberg, C., Küng, N., Schraner, E., Theocharides, A.P.A., and LeibundGut-Landmann, S. (2018). *Candida albicans*-Induced NETosis Is Independent of Peptidylarginine Deiminase 4. *Front. Immunol.* 9.
- Guilliams, M., Dutertre, C.-A., Scott, C.L., McGovern, N., Sichien, D., Chakarov, S., Van Gassen, S., Chen, J., Poidinger, M., De Prijck, S., et al. (2016). Unsupervised High-Dimensional Analysis Aligns Dendritic Cells across Tissues and Species. *Immunity* 45, 669–684.
- Guimarães-Costa, A.B., Nascimento, M.T.C., Froment, G.S., Soares, R.P.P., Morgado, F.N., Conceição-Silva, F., and Saraiva, E.M. (2009). *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 6748–6753.
- Gul, E., Sayar, E.H., Gungor, B., Eroglu, F.K., Surucu, N., Keles, S., Guner, S.N., Findik, S., Alpdundar, E., Ayanoglu, I.C., et al. (2018). Type I IFN-related NETosis in ataxia telangiectasia and Artemis deficiency. *J. Allergy Clin. Immunol.* 142, 246–257.
- Haahtela, T. (2019). A biodiversity hypothesis. *Allergy* 74, 1445–1456.
- Hahn, S., Giaglis, S., Chowdury, C.S., Hösli, I., and Hasler, P. (2013). Modulation of neutrophil NETosis: interplay between infectious agents and underlying host physiology. *Semin. Immunopathol.* 35, 439–453.
- Hakim, A., Fürnrohr, B.G., Amann, K., Laube, B., Abed, U.A., Brinkmann, V., Herrmann, M., Voll, R.E., and Zychlinsky, A. (2010). Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 9813–9818.
- Halverson, T.W.R., Wilton, M., Poon, K.K.H., Petri, B., and Lewenza, S. (2015). DNA is an antimicrobial component of neutrophil extracellular traps. *PLoS Pathog.* 11, e1004593.
- Hammad, H., and Lambrecht, B.N. (2015). Barrier Epithelial Cells and the Control of Type 2 Immunity. *Immunity* 43, 29–40.
- Hammad, H., Chieppa, M., Perros, F., Willart, M.A., Germain, R.N., and Lambrecht, B.N. (2009). House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells. *Nat. Med.* 15, 410–416.

Hammad, H., Plantinga, M., Deswarte, K., Pouliot, P., Willart, M.A.M., Kool, M., Muskens, F., and Lambrecht, B.N. (2010). Inflammatory dendritic cells—not basophils—are necessary and sufficient for induction of Th2 immunity to inhaled house dust mite allergen. *J. Exp. Med.* 207, 2097–2111.

Hartl, D., Krauss-Etschmann, S., Koller, B., Hordijk, P.L., Kuijpers, T.W., Hoffmann, F., Hector, A., Eber, E., Marcos, V., Bittmann, I., et al. (2008). Infiltrated neutrophils acquire novel chemokine receptor expression and chemokine responsiveness in chronic inflammatory lung diseases. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 181, 8053–8067.

Hashimoto, Y., Moki, T., Takizawa, T., Shiratsuchi, A., and Nakanishi, Y. (2007). Evidence for Phagocytosis of Influenza Virus-Infected, Apoptotic Cells by Neutrophils and Macrophages in Mice. *J. Immunol.* 178, 2448–2457.

Hemmers, S., Teijaro, J.R., Arandjelovic, S., and Mowen, K.A. (2011). PAD4-Mediated Neutrophil Extracellular Trap Formation Is Not Required for Immunity against Influenza Infection. *PLOS ONE* 6, e22043.

Hermosilla, C., Caro, T.M., Silva, L.M.R., Ruiz, A., and Taubert, A. (2014). The intriguing host innate immune response: novel anti-parasitic defence by neutrophil extracellular traps. *Parasitology* 141, 1489–1498.

Hess, C., Sadallah, S., Hefti, A., Landmann, R., and Schifferli, J.-A. (1999). Ectosomes Released by Human Neutrophils Are Specialized Functional Units. *J. Immunol.* 163, 4564–4573.

Hidalgo, A., Chilvers, E.R., Summers, C., and Koenderman, L. (2019). The Neutrophil Life Cycle. *Trends Immunol.*

Hofer, U. (2016). Microbiome: Is LPS the key to the hygiene hypothesis? *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 334–335.

Holgate, S.T. (2008). Pathogenesis of Asthma. *Clin. Exp. Allergy* 38, 872–897.

Holgate, S.T. (2010). A Brief History of Asthma and Its Mechanisms to Modern Concepts of Disease Pathogenesis. *Allergy Asthma Immunol. Res.* 2, 165–171.

Holgate, S.T. (2012). Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nat. Med.* 18, 673–683.

Holgate, S.T., and Thomas, M. (2017). Chapter 7 - Asthma. In Middleton's Allergy Essentials, R.E. O'Hehir, S.T. Holgate, and A. Sheikh, eds. (Elsevier), pp. 151–204.

Hollingsworth, J.W., Kleeberger, S.R., and Foster, W.M. (2007). Ozone and Pulmonary Innate Immunity. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 4, 240–246.

Hollingsworth, J.W., Free, M.E., Li, Z., Andrews, L.N., Nakano, H., and Cook, D.N. (2010). Ozone activates pulmonary dendritic cells and promotes allergic sensitization through a Toll-like receptor 4–dependent mechanism. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, 1167–1170.

Holt, P.G., Vines, J., and Bilyk, N. (1988). Effect of Influenza Virus Infection on Allergic Sensitization to Inhaled Antigen in Mice. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 86, 121–123.

Hong, C., Kidani, Y., A-Gonzalez, N., Phung, T., Ito, A., Rong, X., Ericson, K., Mikkola, H., Beaven, S.W., Miller, L.S., et al. (2012). Coordinate regulation of neutrophil homeostasis by liver X receptors in mice. *J. Clin. Invest.* 122, 337–347.

Hoshino, M., Nakamura, Y., and Hamid, Q.A. (2001). Gene expression of vascular endothelial growth factor and its receptors and angiogenesis in bronchial asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 107, 1034–1038.

Hosoki, K., Aguilera-Aguirre, L., Brasier, A.R., Kurosky, A., Boldogh, I., and Sur, S. (2015). Facilitation of Allergic Sensitization and Allergic Airway Inflammation by Pollen-Induced Innate Neutrophil Recruitment. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 54, 81–90.

Hosoki, K., Boldogh, I., Aguilera-Aguirre, L., Sun, Q., Itazawa, T., Hazra, T., Brasier, A.R., Kurosky, A., and Sur, S. (2016). Myeloid differentiation protein 2 facilitates pollen- and cat dander–induced innate and allergic airway inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 137, 1506–1513.e2.

Hosseinzadeh, A., Thompson, P.R., Segal, B.H., and Urban, C.F. (2016). Nicotine induces neutrophil extracellular traps. *J. Leukoc. Biol.* 100, 1105–1112.

Hrusch, C.L., Stein, M.M., Igartua, C., Holbreich, M., Thorne, P.S., Vercelli, D., Von Mutius, E., Ober, C., and Sperling, A.I. (2015). Differences in Immune Regulatory Phenotypes in Two U.S. Farming Populations Mirror Differential Asthma and Atopy Risk: Studies in Amish and Hutterite School Children. In C101. ALLERGIC AIRWAY INFLAMMATION AND HYPERRESPONSIVENESS: NOVEL MECHANISMS AND THERAPY, (American Thoracic Society), pp. A5171–A5171.

Hu, N., Westra, J., Huitema, M.G., Bijl, M., Brouwer, E., Stegeman, C.A., Heeringa, P., Limburg, P.C., and Kallenberg, C.G.M. (2009). Coexpression of CD177 and membrane proteinase 3 on neutrophils in antineutrophil cytoplasmic autoantibody–associated systemic vasculitis: Anti–proteinase

3-mediated neutrophil activation is independent of the role of CD177-expressing neutrophils. *Arthritis Rheum.* 60, 1548–1557.

Huang, Y.J. (2015). The respiratory microbiome and innate immunity in asthma. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 21, 27–32.

Hufford, M.M., Richardson, G., Zhou, H., Manicassamy, B., García-Sastre, A., Enelow, R.I., and Braciale, T.J. (2012). Influenza-Infected Neutrophils within the Infected Lungs Act as Antigen Presenting Cells for Anti-Viral CD8+ T Cells. *PLOS ONE* 7, e46581.

Itakura, A., and McCarty, O.J.T. (2013). Pivotal role for the mTOR pathway in the formation of neutrophil extracellular traps via regulation of autophagy. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 305, C348–C354.

Ito, T., Wang, Y.-H., Duramad, O., Hori, T., Delespesse, G.J., Watanabe, N., Qin, F.X.-F., Yao, Z., Cao, W., and Liu, Y.-J. (2005). TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand. *J. Exp. Med.* 202, 1213–1223.

Jablonska, J., and Granot, Z. (2017). Neutrophil, quo vadis? *J. Leukoc. Biol.* 102, 685–688.

Jackson, D.J., Gangnon, R.E., Evans, M.D., Roberg, K.A., Anderson, E.L., Pappas, T.E., Printz, M.C., Lee, W.-M., Shult, P.A., Reisdorf, E., et al. (2008). Wheezing Rhinovirus Illnesses in Early Life Predict Asthma Development in High-Risk Children. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 178, 667–672.

Jackson, D.J., Evans, M.D., Gangnon, R.E., Tisler, C.J., Pappas, T.E., Lee, W.-M., Gern, J.E., and Lemanske, R.F. (2012). Evidence for a Causal Relationship between Allergic Sensitization and Rhinovirus Wheezing in Early Life. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 185, 281–285.

Jacquemin, B., Schikowski, T., Carsin, A.E., Hansell, A., Krämer, U., Sunyer, J., Probst-Hensch, N., Kauffmann, F., and Künzli, N. (2012). The Role of Air Pollution in Adult-Onset Asthma: A Review of the Current Evidence. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 33, 606–619.

Jaeger, B.N., Donadieu, J., Cognet, C., Bernat, C., Ordoñez-Rueda, D., Barlogis, V., Mahlaoui, N., Fenis, A., Narni-Mancinelli, E., Beaupain, B., et al. (2012). Neutrophil depletion impairs natural killer cell maturation, function, and homeostasis. *J. Exp. Med.* 209, 565–580.

Jansen, M.P.B., Emal, D., Teske, G.J.D., Dessing, M.C., Florquin, S., and Roelofs, J.J.T.H. (2017). Release of extracellular DNA influences renal ischemia reperfusion injury by platelet activation and formation of neutrophil extracellular traps. *Kidney Int.* 91, 352–364.

Jenne, C.N., Wong, C.H.Y., Zemp, F.J., McDonald, B., Rahman, M.M., Forsyth, P.A., McFadden, G., and Kubes, P. (2013). Neutrophils Recruited to Sites of Infection Protect from Virus Challenge by Releasing Neutrophil Extracellular Traps. *Cell Host Microbe* 13, 169–180.

Jensen, J., Warner, T., and Balish, E. (1993). Resistance of SCID Mice to *Candida albicans* Administered Intravenously or Colonizing the Gut: Role of Polymorphonuclear Leukocytes and Macrophages. *J. Infect. Dis.* 167, 912–919.

Jerrett Michael, Shankardass Ketan, Berhane Kiros, Gauderman W. James, Künzli Nino, Avol Edward, Gilliland Frank, Lurmann Fred, Molitor Jassy N., Molitor John T., et al. (2008). Traffic-Related Air Pollution and Asthma Onset in Children: A Prospective Cohort Study with Individual Exposure Measurement. *Environ. Health Perspect.* 116, 1433–1438.

John V. Fahya, B., Kimb, K.W., Liub, J., and Homer A. Bousheya, B. (1995). Prominent neutrophilic inflammation in sputum from subjects with asthma exacerbation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 95, 843–852.

Johnson, C.J., Cabezas-Olcoz, J., Kernien, J.F., Wang, S.X., Beebe, D.J., Huttenlocher, A., Ansari, H., and Nett, J.E. (2016). The Extracellular Matrix of *Candida albicans* Biofilms Impairs Formation of Neutrophil Extracellular Traps. *PLOS Pathog.* 12, e1005884.

Jones, J., Causey, C., Knuckley, B., Slack-Noyes, J.L., and Thompson, P.R. (2009). Protein arginine deiminase 4 (PAD4): current understanding and future therapeutic potential. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 12, 616–627.

Jönsson, F., Mancardi, D.A., Kita, Y., Karasuyama, H., Iannascoli, B., Rooijen, N.V., Shimizu, T., Daëron, M., and Bruhns, P. (2011). Mouse and human neutrophils induce anaphylaxis. *J. Clin. Invest.* 121, 1484–1496.

Julkunen, I., Sareneva, T., Pirhonen, J., Ronni, T., Melén, K., and Matikainen, S. (2001). Molecular pathogenesis of influenza A virus infection and virus-induced regulation of cytokine gene expression. *Cytokine Growth Factor Rev.* 12, 171–180.

Juneau, R.A., Pang, B., Weimer, K.E.D., Armbruster, C.E., and Swords, W.E. (2011). Nontypeable *Haemophilus influenzae* Initiates Formation of Neutrophil Extracellular Traps. *Infect. Immun.* 79, 431–438.

Kafoury, R.M., Pryor, W.A., Squadrito, G.L., Salgo, M.G., Zou, X., and Friedman, M. (1999). Induction of Inflammatory Mediators in Human Airway Epithelial Cells by Lipid Ozonation Products. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 160, 1934–1942.

Kafoury, R.M., Hernandez, J.M., Lasky, J.A., Toscano, W.A., and Friedman, M. (2007). Activation of transcription factor IL-6 (NF-IL-6) and nuclear factor- κ B (NF- κ B) by lipid ozonation products is crucial to interleukin-8 gene expression in human airway epithelial cells. *Environ. Toxicol.* 22, 159–168.

Kalliomäki, M., Kirjavainen, P., Eerola, E., Kero, P., Salminen, S., and Isolauri, E. (2001). Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. *J. Allergy Clin. Immunol.* 107, 129–134.

Karsunky, H., Zeng, H., Schmidt, T., Zevnik, B., Kluge, R., Schmid, K.W., Dührsen, U., and Mörröy, T. (2002). Inflammatory reactions and severe neutropenia in mice lacking the transcriptional repressor Gfi1. *Nat. Genet.* 30, 295–300.

Katayama, Y., Battista, M., Kao, W.-M., Hidalgo, A., Peired, A.J., Thomas, S.A., and Frenette, P.S. (2006). Signals from the Sympathetic Nervous System Regulate Hematopoietic Stem Cell Egress from Bone Marrow. *Cell* 124, 407–421.

Keshari, R.S., Jyoti, A., Dubey, M., Kothari, N., Kohli, M., Bogra, J., Barthwal, M.K., and Dikshit, M. (2012). Cytokines Induced Neutrophil Extracellular Traps Formation: Implication for the Inflammatory Disease Condition. *PLOS ONE* 7, e48111.

Kim, B.-J., Kwon, J.-W., Seo, J.-H., Kim, H.-B., Lee, S.-Y., Park, K.-S., Yu, J., Kim, H.-C., Leem, J.-H., Sakong, J., et al. (2011). Association of ozone exposure with asthma, allergic rhinitis, and allergic sensitization. *Ann. Allergy. Asthma. Immunol.* 107, 214-219.e1.

Kim, H.Y., DeKruyff, R.H., and Umetsu, D.T. (2010). The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity. *Nat. Immunol.* 11, 577–584.

Kim, H.Y., Chang, Y.-J., Subramanian, S., Lee, H.-H., Albacker, L.A., Matangkasombut, P., Savage, P.B., McKenzie, A.N.J., Smith, D.E., Rottman, J.B., et al. (2012). Innate lymphoid cells

responding to IL-33 mediate airway hyperreactivity independently of adaptive immunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* *129*, 216-227.e6.

Kleij, D. van der, Latz, E., Brouwers, J.F.H.M., Kruize, Y.C.M., Schmitz, M., Kurt-Jones, E.A., Espevik, T., Jong, E.C. de, Kapsenberg, M.L., Golenbock, D.T., et al. (2002). A Novel Host-Parasite Lipid Cross-talk SCHISTOSOMAL LYSO-PHOSPHATIDYLSERINE ACTIVATES TOLL-LIKE RECEPTOR 2 AND AFFECTS IMMUNE POLARIZATION. *J. Biol. Chem.* *277*, 48122–48129.

Koga, H., Miyahara, N., Fuchimoto, Y., Ikeda, G., Waseda, K., Ono, K., Tanimoto, Y., Kataoka, M., Gelfand, E.W., Tanimoto, M., et al. (2013). Inhibition of neutrophil elastase attenuates airway hyperresponsiveness and inflammation in a mouse model of secondary allergen challenge: neutrophil elastase inhibition attenuates allergic airway responses. *Respir. Res.* *14*, 8.

Kohri, K., Ueki, I.F., and Nadel, J.A. (2002). Neutrophil elastase induces mucin production by ligand-dependent epidermal growth factor receptor activation. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* *283*, L531–L540.

Koike, E., and Kobayashi, T. (2004). Ozone exposure enhances antigen-presenting activity of interstitial lung cells in rats. *Toxicology* *196*, 217–227.

Kolaczkowska, E., and Kubes, P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* *13*, 159–175.

Kotaniemi-Syrjänen, A., Vainionpää, R., Reijonen, T.M., Waris, M., Korhonen, K., and Korppi, M. (2003). Rhinovirus-induced wheezing in infancy—the first sign of childhood asthma? *J. Allergy Clin. Immunol.* *111*, 66–71.

Kreijtz, J.H.C.M., Fouchier, R.A.M., and Rimmelzwaan, G.F. (2011). Immune responses to influenza virus infection. *Virus Res.* *162*, 19–30.

Kreisel, D., Nava, R.G., Li, W., Zinselmeyer, B.H., Wang, B., Lai, J., Pless, R., Gelman, A.E., Krupnick, A.S., and Miller, M.J. (2010). In vivo two-photon imaging reveals monocyte-dependent neutrophil extravasation during pulmonary inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 18073–18078.

Kubala, S., Ge, M., Redai, I., Soni, M., Chen, B., Yang, Q., Bhandoola, A., Cohen, N., and Haczku, A. (2014). Ozone Inhalation Induces Epithelial IL-33 and Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP) and Leads To Eosinophilic Airway Inflammation: 510. *J. Allergy Clin. Immunol.* *133*.

Kumagai, K., Lewandowski, R.P., Jackson-Humbles, D.N., Buglak, N., Li, N., White, K., Van Dyken, S.J., Wagner, J.G., and Harkema, J.R. (2017). Innate Lymphoid Cells Mediate Pulmonary Eosinophilic Inflammation, Airway Mucous Cell Metaplasia, and Type 2 Immunity in Mice Exposed to Ozone. *Toxicol. Pathol.* *45*, 692–704.

Kusel, M.M.H., de Klerk, N.H., Kebabze, T., Vohma, V., Holt, P.G., Johnston, S.L., and Sly, P.D. (2007). Early-life respiratory viral infections, atopic sensitization, and risk of subsequent development of persistent asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* *119*, 1105–1110.

Lambrecht, B.N., and Hammad, H. (2012). The airway epithelium in asthma. *Nat. Med.* *18*, 684–692.

Lambrecht, B.N., and Hammad, H. (2014). Allergens and the airway epithelium response: Gateway to allergic sensitization. *J. Allergy Clin. Immunol.* *134*, 499–507.

Lambrecht, B.N., and Hammad, H. (2015). The immunology of asthma. *Nat. Immunol.* *16*, 45–56.

Lambrecht, B.N., and Hammad, H. (2017). The immunology of the allergy epidemic and the hygiene hypothesis. *Nat. Immunol.* *18*, 1076–1083.

Lambrecht, B.N., Persson, E.K., and Hammad, H. (2017). Myeloid Cells in Asthma. *Microbiol. Spectr.* *5*.

Lampi, J., Canoy, D., Jarvis, D., Hartikainen, A.-L., Keski-Nisula, L., Järvelin, M.-R., and Pekkanen, J. (2011). Farming environment and prevalence of atopy at age 31: prospective birth cohort study in Finland. *Clin. Exp. Allergy* *41*, 987–993.

Lande, R., Ganguly, D., Facchinetti, V., Frasca, L., Conrad, C., Gregorio, J., Meller, S., Chamilos, G., Sebasigari, R., Ricciari, V., et al. (2011). Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci. Transl. Med.* *3*, 73ra19.

Landzberg, M., Doering, H., Aboodi, G.M., Tenenbaum, H.C., and Glogauer, M. (2015). Quantifying oral inflammatory load: oral neutrophil counts in periodontal health and disease. *J. Periodontal Res.* *50*, 330–336.

Lauener, R.P., Goyert, S.M., Geha, R.S., and Vercelli, D. (1990). Interleukin 4 down-regulates the expression of CD14 in normal human monocytes. *Eur. J. Immunol.* *20*, 2375–2381.

Lavinskiene, S., Bajoriuniene, I., Malakauskas, K., Jeroch, J., and Sakalauskas, R. (2014). Sputum neutrophil count after bronchial allergen challenge is related to peripheral blood neutrophil chemotaxis in asthma patients. *Inflamm. Res.* 63, 951–959.

Le Goffic, R., Arshad, M.I., Rauch, M., L'Helgoualc'h, A., Delmas, B., Piquet-Pellorce, C., and Samson, M. (2011). Infection with Influenza Virus Induces IL-33 in Murine Lungs. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 45, 1125–1132.

Lee, C.G., Link, H., Baluk, P., Homer, R.J., Chapoval, S., Bhandari, V., Kang, M.J., Cohn, L., Kim, Y.K., McDonald, D.M., et al. (2004). Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces remodeling and enhances T_H2-mediated sensitization and inflammation in the lung. *Nat. Med.* 10, 1095–1103.

Leliefeld, P.H.C., Koenderman, L., and Pillay, J. (2015). How Neutrophils Shape Adaptive Immune Responses. *Front. Immunol.* 6.

Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I., and Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 678–689.

Ley, K., Hoffman, H.M., Kubes, P., Cassatella, M.A., Zychlinsky, A., Hedrick, C.C., and Catz, S.D. (2018). Neutrophils: New insights and open questions. *Sci. Immunol.* 3, eaat4579.

Leynaert, B., Neukirch, C., Jarvis, D., Chinn, S., Burney, P., and Neukirch, F. (2001). Does Living on a Farm during Childhood Protect against Asthma, Allergic Rhinitis, and Atopy in Adulthood? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164, 1829–1834.

Li, Z., Potts-Kant, E.N., Garantziotis, S., Foster, W.M., and Hollingsworth, J.W. (2011). Hyaluronan Signaling during Ozone-Induced Lung Injury Requires TLR4, MyD88, and TIRAP. *PLOS ONE* 6, e27137.

Lien, D.C., Wagner, W.W., Capen, R.L., Haslett, C., Hanson, W.L., Hofmeister, S.E., Henson, P.M., and Worthen, G.S. (1987). Physiological neutrophil sequestration in the lung: visual evidence for localization in capillaries. *J. Appl. Physiol.* 62, 1236–1243.

Liew, P.X., and Kubes, P. (2019). The Neutrophil's Role During Health and Disease. *Physiol. Rev.* 99, 1223–1248.

Lim, K., Hyun, Y.-M., Lambert-Emo, K., Capece, T., Bae, S., Miller, R., Topham, D.J., and Kim, M. (2015). Neutrophil trails guide influenza-specific CD8⁺ T cells in the airways. *Science* 349.

Lin Shao, Liu Xiu, Le Linh H., and Hwang Syni-An (2008). Chronic Exposure to Ambient Ozone and Asthma Hospital Admissions among Children. *Environ. Health Perspect.* 116, 1725–1730.

Liu, A.H. (2002). Endotoxin exposure in allergy and asthma: Reconciling a paradox. *J. Allergy Clin. Immunol.* 109, 379–392.

Liu, F., Wu, H.Y., Wesselschmidt, R., Kornaga, T., and Link, D.C. (1996). Impaired Production and Increased Apoptosis of Neutrophils in Granulocyte Colony-Stimulating Factor Receptor-Deficient Mice. *Immunity* 5, 491–501.

Liu, L., Pan, Y., Zhu, Y., Song, Y., Su, X., Yang, L., and Li, M. (2017a). Association between rhinovirus wheezing illness and the development of childhood asthma: a meta-analysis. *BMJ Open* 7, e013034.

Liu, S., Su, X., Pan, P., Zhang, L., Hu, Y., Tan, H., Wu, D., Liu, B., Li, H., Li, H., et al. (2016). Neutrophil extracellular traps are indirectly triggered by lipopolysaccharide and contribute to acute lung injury. *Sci. Rep.* 6, 37252.

Liu, T., Wang, F.-P., Wang, G., and Mao, H. (2017b). Role of Neutrophil Extracellular Traps in Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Chin. Med. J. (Engl.)* 130, 730–736.

Liu, W., Yan, M., Liu, Y., McLeish, K.R., Coleman, W.G., and Rodgers, G.P. (2012). Olfactomedin 4 Inhibits Cathepsin C-Mediated Protease Activities, Thereby Modulating Neutrophil Killing of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in Mice. *J. Immunol.* 189, 2460–2467.

Lloyd, C.M., and Hessel, E.M. (2010). Functions of T cells in asthma: more than just T_H2 cells. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 838–848.

Locksley, R.M. (2010). Asthma and Allergic Inflammation. *Cell* 140, 777–783.

Loftus, P.A., and Wise, S.K. (2016). Epidemiology of asthma. *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 24, 245.

Lommatzsch, M., Julius, P., Kuepper, M., Garn, H., Bratke, K., Irmscher, S., Luttmann, W., Renz, H., Braun, A., and Virchow, J.C. (2006). The course of allergen-induced leukocyte infiltration in human and experimental asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 118, 91–97.

Lood, C., Blanco, L.P., Purmalek, M.M., Carmona-Rivera, C., De Ravin, S.S., Smith, C.K., Malech, H.L., Ledbetter, J.A., Elkon, K.B., and Kaplan, M.J. (2016). Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease. *Nat. Med.* 22, 146–153.

Lukkarinen, M., Koistinen, A., Turunen, R., Lehtinen, P., Vuorinen, T., and Jartti, T. (2017). Rhinovirus-induced first wheezing episode predicts atopic but not nonatopic asthma at school age. *J. Allergy Clin. Immunol.* 140, 988–995.

Machiels, B., Dourcy, M., Xiao, X., Javaux, J., Mesnil, C., Sabatel, C., Desmecht, D., Lallemand, F., Martinive, P., Hammad, H., et al. (2017). A gammaherpesvirus provides protection against allergic asthma by inducing the replacement of resident alveolar macrophages with regulatory monocytes. *Nat. Immunol.* 18, 1310–1320.

Maes, T., Cobos, F.A., Schleich, F., Sorbello, V., Henket, M., Preter, K.D., Bracke, K.R., Conickx, G., Mesnil, C., Vandesompele, J., et al. (2016). Asthma inflammatory phenotypes show differential microRNA expression in sputum. *J. Allergy Clin. Immunol.* 137, 1433–1446.

Maffia, P.C., Zittermann, S.E., Scimone, M.L., Tateosian, N., Amiano, N., Guerrieri, D., Lutzky, V., Rosso, D., Romeo, H.E., Garcia, V.E., et al. (2007). Neutrophil elastase converts human immature dendritic cells into transforming growth factor-beta1-secreting cells and reduces allostimulatory ability. *Am. J. Pathol.* 171, 928–937.

Manise, M., Holtappels, G., Crombruggen, K.V., Schleich, F., Bachert, C., and Louis, R. (2013). Sputum IgE and Cytokines in Asthma: Relationship with Sputum Cellular Profile. *PLOS ONE* 8, e58388.

Martin, T.R., and Frevert, C.W. (2005). Innate Immunity in the Lungs. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2, 403–411.

Martin, C., Burdon, P.C.E., Bridger, G., Gutierrez-Ramos, J.-C., Williams, T.J., and Rankin, S.M. (2003). Chemokines Acting via CXCR2 and CXCR4 Control the Release of Neutrophils from the Bone Marrow and Their Return following Senescence. *Immunity* 19, 583–593.

Martin, R.J., Cicutto, L.C., Smith, H.R., Ballard, R.D., and Szeffler, S.J. (1991). Airways Inflammation in Nocturnal Asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* 143, 351–357.

Martinod, K., Witsch, T., Farley, K., Gallant, M., Remold-O'Donnell, E., and Wagner, D.D. (2016). Neutrophil elastase-deficient mice form neutrophil extracellular traps in an experimental model of deep vein thrombosis. *J. Thromb. Haemost. JTH* 14, 551–558.

Massena, S., Christoffersson, G., Vågesjö, E., Seignez, C., Gustafsson, K., Binet, F., Hidalgo, C.H., Giraud, A., Lomei, J., Weström, S., et al. (2015). Identification and characterization of VEGF-A-responsive neutrophils expressing CD49d, VEGFR1, and CXCR4 in mice and humans. *Blood* 126, 2016–2026.

Matsumura, Y. (1970). The Effects of Ozone, Nitrogen Dioxide, and Sulfur Dioxide on the Experimentally Induced Allergic Respiratory Disorder in Guinea Pigs. *Am. Rev. Respir. Dis.* 102, 430–437.

Maugeri, N., Campana, L., Gavina, M., Covino, C., Metrio, M.D., Panciroli, C., Maiuri, L., Maseri, A., D'Angelo, A., Bianchi, M.E., et al. (2014). Activated platelets present high mobility group box 1 to neutrophils, inducing autophagy and promoting the extrusion of neutrophil extracellular traps. *J. Thromb. Haemost.* 12, 2074–2088.

McConnell, R., Berhane, K., Gilliland, F., London, S.J., Islam, T., Gauderman, W.J., Avol, E., Margolis, H.G., and Peters, J.M. (2002). Asthma in exercising children exposed to ozone: a cohort study. *The Lancet* 359, 386–391.

McDonald, B., Urrutia, R., Yipp, B.G., Jenne, C.N., and Kubes, P. (2012). Intravascular Neutrophil Extracellular Traps Capture Bacteria from the Bloodstream during Sepsis. *Cell Host Microbe* 12, 324–333.

McDonnell, W.F., Abbey, D.E., Nishino, N., and Lebowitz, M.D. (1999). Long-Term Ambient Ozone Concentration and the Incidence of Asthma in Nonsmoking Adults: The Ahsmog Study. *Environ. Res.* 80, 110–121.

Megiovanni, A.M., Sanchez, F., Robledo-Sarmiento, M., Morel, C., Gluckman, J.C., and Boudaly, S. (2006). Polymorphonuclear neutrophils deliver activation signals and antigenic molecules to dendritic cells: a new link between leukocytes upstream of T lymphocytes. *J. Leukoc. Biol.* 79, 977–988.

Mesnil, C., Sabatel, C.M., Marichal, T., Toussaint, M., Cataldo, D., Drion, P.-V., Lekeux, P., Bureau, F., and Desmet, C.J. (2012). Resident CD11b+Ly6C– Lung Dendritic Cells Are Responsible for Allergic Airway Sensitization to House Dust Mite in Mice. *PLOS ONE* 7, e53242.

Mestas, J., and Hughes, C.C.W. (2004). Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. *J. Immunol.* *172*, 2731–2738.

Meyer, N., and Akdis, C.A. (2013). Vascular Endothelial Growth Factor as a Key Inducer of Angiogenesis in the Asthmatic Airways. *Curr. Allergy Asthma Rep.* *13*, 1–9.

Michaudel, C., Mackowiak, C., Maillet, I., Fauconnier, L., Akdis, C.A., Sokolowska, M., Dreher, A., Tan, H.-T.T., Quesniaux, V.F., Ryffel, B., et al. (2018). Ozone exposure induces respiratory barrier biphasic injury and inflammation controlled by IL-33. *J. Allergy Clin. Immunol.* *142*, 942–958.

Michel, O., Kips, J., Duchateau, J., Vertongen, F., Robert, L., Collet, H., Pauwels, R., and Sergysels, R. (1996). Severity of asthma is related to endotoxin in house dust. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *154*, 1641–1646.

Mikhail, I., and Grayson, M.H. (2019). Asthma and viral infections: An intricate relationship. *Ann. Allergy. Asthma. Immunol.* *123*, 352–358.

Millien, V.O., Lu, W., Shaw, J., Yuan, X., Mak, G., Roberts, L., Song, L.-Z., Knight, J.M., Creighton, C.J., Luong, A., et al. (2013). Cleavage of Fibrinogen by Proteinases Elicits Allergic Responses Through Toll-Like Receptor 4. *Science* *341*, 792–796.

Mitroulis, I., Kambas, K., Chrysanthopoulou, A., Skendros, P., Apostolidou, E., Kourtzelis, I., Drosos, G.I., Boumpas, D.T., and Ritis, K. (2011). Neutrophil Extracellular Trap Formation Is Associated with IL-1 β and Autophagy-Related Signaling in Gout. *PLOS ONE* *6*, e29318.

Monteseirín, J., Camacho, M.J., Montaña, R., Llamas, E., Conde, M., Carballo, M., Guardia, P., Conde, J., and Sobrino, F. (1996). Enhancement of Antigen-specific functional responses by neutrophils from allergic patients. *J. Exp. Med.* *183*, 2571–2579.

Monteseirín, J., Bonilla, I., Camacho, M.J., Conde, J., and Sobrino, F. (2001). IgE-dependent release of myeloperoxidase by neutrophils from allergic patients. *Clin. Exp. Allergy* *31*, 889–892.

Monteseirín, J., Bonilla, I., Camacho, M.J., Chacón, P., Vega, A., Chaparro, A., Conde, J., and Sobrino, F. (2003). Specific Allergens Enhance Elastase Release in Stimulated Neutrophils from Asthmatic Patients. *Int. Arch. Allergy Immunol.* *131*, 174–181.

Monteseirín, J., Chacón, P., Vega, A., El Bekay, R., Alvarez, M., Alba, G., Conde, M., Jiménez, J., Asturias, J.A., Martínez, A., et al. (2004). Human neutrophils synthesize IL-8 in an IgE-mediated activation. *J. Leukoc. Biol.* 76, 692–700.

Mosca, T., Menezes, M.C.S., Silva, A.V., Stirbulov, R., and Forte, W.C.N. (2015). Chemotactic and Phagocytic Activity of Blood Neutrophils in Allergic Asthma. *Immunol. Invest.* 44, 509–520.

Moses, K., and Brandau, S. (2016). Human neutrophils: Their role in cancer and relation to myeloid-derived suppressor cells. *Semin. Immunol.* 28, 187–196.

von Mutius, E., and Vercelli, D. (2010). Farm living: effects on childhood asthma and allergy. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 861–868.

Nakashima, K., Arai, S., Suzuki, A., Nariai, Y., Urano, T., Nakayama, M., Ohara, O., Yamamura, K., Yamamoto, K., and Miyazaki, T. (2013). PAD4 regulates proliferation of multipotent haematopoietic cells by controlling c-myc expression. *Nat. Commun.* 4, 1–8.

Narasaraju, T., Yang, E., Samy, R.P., Ng, H.H., Poh, W.P., Liew, A.-A., Phoon, M.C., van Rooijen, N., and Chow, V.T. (2011). Excessive Neutrophils and Neutrophil Extracellular Traps Contribute to Acute Lung Injury of Influenza Pneumonitis. *Am. J. Pathol.* 179, 199–210.

Nathan, A.T., Peterson, E.A., Chakir, J., and Wills-Karp, M. (2009). Innate immune responses of airway epithelium to house dust mite are mediated through β -glucan-dependent pathways. *J. Allergy Clin. Immunol.* 123, 612–618.

Nauseef, W.M., and Borregaard, N. (2014). Neutrophils at work. *Nat. Immunol.* 15, 602–611.

Netea, M.G., van Deuren, M., Kullberg, B.J., Cavaillon, J.-M., and Van der Meer, J.W.M. (2002). Does the shape of lipid A determine the interaction of LPS with Toll-like receptors? *Trends Immunol.* 23, 135–139.

Neuhaus-Steinmetz, U., Uffhausen, F., Herz, U., and Renz, H. (2000). Priming of allergic immune responses by repeated ozone exposure in mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 23, 228–233.

Nishimura, K.K., Galanter, J.M., Roth, L.A., Oh, S.S., Thakur, N., Nguyen, E.A., Thyne, S., Farber, H.J., Serebrisky, D., Kumar, R., et al. (2013). Early-Life Air Pollution and Asthma Risk in Minority Children. The GALA II and SAGE II Studies. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 188, 309–318.

Nishio, N., Okawa, Y., Sakurai, H., and Isobe, K. (2008). Neutrophil depletion delays wound repair in aged mice. *AGE* 30, 11–19.

Noges, L.E., White, J., Cambier, J.C., Kappler, J.W., and Marrack, P. (2016). Contamination of DNase Preparations Confounds Analysis of the Role of DNA in Alum-Adjuvanted Vaccines. *J. Immunol.* 197, 1221–1230.

Norzila, M.Z., Fakes, K., Henry, R.L., Simpson, J., and Gibson, P.G. (2000). Interleukin-8 Secretion and Neutrophil Recruitment Accompanies Induced Sputum Eosinophil Activation in Children with Acute Asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161, 769–774.

Nourshargh, S., Renshaw, S.A., and Imhof, B.A. (2016). Reverse Migration of Neutrophils: Where, When, How, and Why? *Trends Immunol.* 37, 273–286.

Nuvolone, D., Petri, D., and Voller, F. (2018). The effects of ozone on human health. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 8074–8088.

Odobasic, D., Kitching, A.R., Yang, Y., O’Sullivan, K.M., Muljadi, R.C.M., Edgtton, K.L., Tan, D.S.Y., Summers, S.A., Morand, E.F., and Holdsworth, S.R. (2013). Neutrophil myeloperoxidase regulates T-cell-driven tissue inflammation in mice by inhibiting dendritic cell function. *Blood* 121, 4195–4204.

Ordoñez-Rueda, D., Jönsson, F., Mancardi, D.A., Zhao, W., Malzac, A., Liang, Y., Bertosio, E., Grenot, P., Blanquet, V., Sabrautzki, S., et al. (2012). A hypomorphic mutation in the Gfi1 transcriptional repressor results in a novel form of neutropenia. *Eur. J. Immunol.* 42, 2395–2408.

Osebold, J.W., Gershwin, L.J., and Zee, Y.C. (1980). Studies on the enhancement of allergic lung sensitization by inhalation of ozone and sulfuric acid aerosol. *J. Environ. Pathol. Toxicol.* 3, 221–234.

Österlund, C., Grönlund, H., Polovic, N., Sundström, S., Gafvelin, G., and Bucht, A. (2009). The non-proteolytic house dust mite allergen Der p 2 induce NF- κ B and MAPK dependent activation of bronchial epithelial cells. *Clin. Exp. Allergy* 39, 1199–1208.

Oyoshi, M.K., He, R., Li, Y., Mondal, S., Yoon, J., Afshar, R., Chen, M., Lee, D.M., Luo, H.R., Luster, A.D., et al. (2012). Leukotriene B₄-Driven Neutrophil Recruitment to the Skin Is Essential for Allergic Skin Inflammation. *Immunity* 37, 747–758.

- Papayannopoulos, V. (2015). Sweet NETs, Bitter Wounds. *Immunity* 43, 223–225.
- Papayannopoulos, V. (2017). Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat. Rev. Immunol.* nri.2017.105.
- Papayannopoulos, V., Metzler, K.D., Hakkim, A., and Zychlinsky, A. (2010). Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* 191, 677–691.
- Parker, H., Dragunow, M., Hampton, M.B., Kettle, A.J., and Winterbourn, C.C. (2012a). Requirements for NADPH oxidase and myeloperoxidase in neutrophil extracellular trap formation differ depending on the stimulus. *J. Leukoc. Biol.* 92, 841–849.
- Parker, H., Albrett, A.M., Kettle, A.J., and Winterbourn, C.C. (2012b). Myeloperoxidase associated with neutrophil extracellular traps is active and mediates bacterial killing in the presence of hydrogen peroxide. *J. Leukoc. Biol.* 91, 369–376.
- Pascual, R.M., and Peters, S.P. (2005). Airway remodeling contributes to the progressive loss of lung function in asthma: An overview. *J. Allergy Clin. Immunol.* 116, 477–486.
- Paul, W.E., and Zhu, J. (2010). How are T_H2-type immune responses initiated and amplified? *Nat. Rev. Immunol.* 10, 225–235.
- Pedrosa, J., Saunders, B.M., Appelberg, R., Orme, I.M., Silva, M.T., and Cooper, A.M. (2000). Neutrophils Play a Protective Nonphagocytic Role in Systemic Mycobacterium tuberculosis Infection of Mice. *Infect. Immun.* 68, 577–583.
- Perez, L., Declercq, C., Iñiguez, C., Aguilera, I., Badaloni, C., Ballester, F., Bouland, C., Chanel, O., Cirarda, F.B., Forastiere, F., et al. (2013). Chronic burden of near-roadway traffic pollution in 10 European cities (APHEKOM network). *Eur. Respir. J.* 42, 594–605.
- Peters, A.M., Saverymuttu, S.H., Keshavarzian, A., Bell, R.N., and Lavender, J.P. (1985). Splenic pooling of granulocytes. *Clin. Sci.* 68, 283–289.
- Peters, N.C., Egen, J.G., Secundino, N., Debrabant, A., Kimblin, N., Kamhawi, S., Lawyer, P., Fay, M.P., Germain, R.N., and Sacks, D. (2008). In Vivo Imaging Reveals an Essential Role for Neutrophils in Leishmaniasis Transmitted by Sand Flies. *Science* 321, 970–974.

Pfefferle, P.I., Büchele, G., Blümer, N., Roponen, M., Ege, M.J., Krauss-Etschmann, S., Genuneit, J., Hyvärinen, A., Hirvonen, M.-R., Lauener, R., et al. (2010). Cord blood cytokines are modulated by maternal farming activities and consumption of farm dairy products during pregnancy: The PASTURE Study. *J. Allergy Clin. Immunol.* *125*, 108-115.e3.

Phillipson, M., Kaur, J., Colarusso, P., Ballantyne, C.M., and Kubes, P. (2008). Endothelial Domes Encapsulate Adherent Neutrophils and Minimize Increases in Vascular Permeability in Paracellular and Transcellular Emigration. *PLOS ONE* *3*, e1649.

Phipatanakul, W., Celedón, J.C., Raby, B.A., Litonjua, A.A., Milton, D.K., Sredl, D., Weiss, S.T., and Gold, D.R. (2004). Endotoxin Exposure and Eczema in the First Year of Life. *Pediatrics* *114*, 13–18.

Pichavant, M., Goya, S., Meyer, E.H., Johnston, R.A., Kim, H.Y., Matangkasombut, P., Zhu, M., Iwakura, Y., Savage, P.B., DeKruyff, R.H., et al. (2008). Ozone exposure in a mouse model induces airway hyperreactivity that requires the presence of natural killer T cells and IL-17. *J. Exp. Med.* *205*, 385–393.

Pillay, J., Braber, I. den, Vrisekoop, N., Kwast, L.M., Boer, R.J. de, Borghans, J.A.M., Tesselaar, K., and Koenderman, L. (2010). In vivo labeling with $^2\text{H}_2\text{O}$ reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood* *116*, 625–627.

Pillay, J., Kamp, V.M., van Hoffen, E., Visser, T., Tak, T., Lammers, J.-W., Ulfman, L.H., Leenen, L.P., Pickkers, P., and Koenderman, L. (2012). A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *J. Clin. Invest.* *122*, 327–336.

Pilszczek, F.H., Salina, D., Poon, K.K.H., Fahey, C., Yipp, B.G., Sibley, C.D., Robbins, S.M., Green, F.H.Y., Surette, M.G., Sugai, M., et al. (2010). A Novel Mechanism of Rapid Nuclear Neutrophil Extracellular Trap Formation in Response to *Staphylococcus aureus*. *J. Immunol.* *185*, 7413–7425.

Plantinga, M., Guillems, M., Vanheerswyngheles, M., Deswarte, K., Branco-Madeira, F., Toussaint, W., Vanhoutte, L., Neyt, K., Killeen, N., Malissen, B., et al. (2013). Conventional and monocyte-derived CD11b(+) dendritic cells initiate and maintain T helper 2 cell-mediated immunity to house dust mite allergen. *Immunity* *38*, 322–335.

Pliyev, B.K., Kalintseva, M.V., Abdulaeva, S.V., Yarygin, K.N., and Savchenko, V.G. (2014). Neutrophil microparticles modulate cytokine production by natural killer cells. *Cytokine* *65*, 126–129.

Poehling, K.A., Edwards, K.M., Weinberg, G.A., Szilagyi, P., Staat, M.A., Iwane, M.K., Bridges, C.B., Grijalva, C.G., Zhu, Y., Bernstein, D.I., et al. (2006). The Underrecognized Burden of Influenza in Young Children. *N. Engl. J. Med.* 355, 31–40.

Poorisrisak, P., Halkjaer, L.B., Thomsen, S.F., Stensballe, L.G., Kyvik, K.O., Skytthe, A., Schioetz, P.O., and Bisgaard, H. (2010). Causal Direction Between Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis and Asthma Studied in Monozygotic Twins. *Chest* 138, 338–344.

Portengen, L., Preller, L., Tielen, M., Doekes, G., and Heederik, D. (2005). Endotoxin exposure and atopic sensitization in adult pig farmers. *J. Allergy Clin. Immunol.* 115, 797–802.

Post, S., Nawijn, M.C., Hackett, T.L., Baranowska, M., Gras, R., Oosterhout, A.J.M. van, and Heijink, I.H. (2012). The composition of house dust mite is critical for mucosal barrier dysfunction and allergic sensitisation. *Thorax* 67, 488–495.

Postnikoff, C.K., and Nichols, K.K. (2017). Neutrophil and T-Cell Homeostasis in the Closed Eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 58, 6212–6220.

Pothoven, K.L., Norton, J.E., Hulse, K.E., Suh, L.A., Carter, R.G., Rocci, E., Harris, K.E., Shintani-Smith, S., Conley, D.B., Chandra, R.K., et al. (2015). Oncostatin M promotes mucosal epithelial barrier dysfunction, and its expression is increased in patients with eosinophilic mucosal disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 136, 737-746.e4.

Pothoven, K.L., Norton, J.E., Suh, L.A., Carter, R.G., Harris, K.E., Biyasheva, A., Welch, K., Shintani-Smith, S., Conley, D.B., Liu, M.C., et al. (2017). Neutrophils are a major source of the epithelial barrier disrupting cytokine oncostatin M in patients with mucosal airways disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 139, 1966-1978.e9.

Préfontaine, D., Nadigel, J., Chouiali, F., Audusseau, S., Semlali, A., Chakir, J., Martin, J.G., and Hamid, Q. (2010). Increased IL-33 expression by epithelial cells in bronchial asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, 752–754.

Pulfer, M.K., and Murphy, R.C. (2004). Formation of Biologically Active Oxysterols during Ozonolysis of Cholesterol Present in Lung Surfactant. *J. Biol. Chem.* 279, 26331–26338.

Qiu, S.-L., Zhang, H., Tang, Q.-Y., Bai, J., He, Z.-Y., Zhang, J.-Q., Li, M.-H., Deng, J.-M., Liu, G.-N., and Zhong, X.-N. (2017). Neutrophil extracellular traps induced by cigarette smoke activate plasmacytoid dendritic cells. *Thorax* 72, 1084–1093.

Radermecker, C., Louis, R., Bureau, F., and Marichal, T. (2018). Role of neutrophils in allergic asthma. *Curr. Opin. Immunol.* *54*, 28–34.

Radon, K., Windstetter, D., Eckart, J., Dressel, H., Leitritz, L., Reichert, J., Schmid, M., Praml, G., Schosser, M., Mutius, E.V., et al. (2004). Farming exposure in childhood, exposure to markers of infections and the development of atopy in rural subjects. *Clin. Exp. Allergy* *34*, 1178–1183.

Ramirez-Velazquez, C., Beristain-Covarrubias, N., Guido-Bayardo, L., and Ortiz-Navarrete, V. (2014). Peripheral blood T cells and neutrophils from asthma patients express class-I MHC-restricted T cell-associated molecule. *Allergy Asthma Clin. Immunol.* *10*, 46.

Reber, L.L., Hernandez, J.D., and Galli, S.J. (2017a). The pathophysiology of anaphylaxis. *J. Allergy Clin. Immunol.* *140*, 335–348.

Reber, L.L., Gillis, C.M., Starkl, P., Jönsson, F., Sibilano, R., Marichal, T., Gaudenzio, N., Bérard, M., Rogalla, S., Contag, C.H., et al. (2017b). Neutrophil myeloperoxidase diminishes the toxic effects and mortality induced by lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* *214*, 1249–1258.

Reinhardt, R.L., Liang, H.-E., and Locksley, R.M. (2009). Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire. *Nat. Immunol.* *10*, 385–393.

Reutershan, J., Morris, M.A., Burcin, T.L., Smith, D.F., Chang, D., Saprito, M.S., and Ley, K. (2006). Critical role of endothelial CXCR2 in LPS-induced neutrophil migration into the lung. *J. Clin. Invest.* *116*, 695–702.

Ribeiro-Gomes, F.L., Moniz-de-Souza, M.C.A., Alexandre-Moreira, M.S., Dias, W.B., Lopes, M.F., Nunes, M.P., Lungarella, G., and DosReis, G.A. (2007). Neutrophils Activate Macrophages for Intracellular Killing of *Leishmania major* through Recruitment of TLR4 by Neutrophil Elastase. *J. Immunol.* *179*, 3988–3994.

Richter, W., Vogel, V., Howe, J., Steiniger, F., Brauser, A., Koch, M.H., Roessle, M., Gutsmann, T., Garidel, P., Mäntele, W., et al. (2011). Morphology, size distribution, and aggregate structure of lipopolysaccharide and lipid A dispersions from enterobacterial origin. *Innate Immun.* *17*, 427–438.

Riedler, Eder, Oberfeld, and Schreuer (2000). Austrian children living on a farm have less hay fever, asthma and allergic sensitization. *Clin. Immunol. Allergy* *30*, 194–200.

Rochael, N.C., Guimarães-Costa, A.B., Nascimento, M.T.C., DeSouza-Vieira, T.S., Oliveira, M.P., Garcia e Souza, L.F., Oliveira, M.F., and Saraiva, E.M. (2015). Classical ROS-dependent and early/rapid ROS-independent release of Neutrophil Extracellular Traps triggered by *Leishmania* parasites. *Sci. Rep.* 5.

Rocks, N., Vanwinge, C., Radermecker, C., Blacher, S., Gilles, C., Marée, R., Gillard, A., Evrard, B., Pequeux, C., Marichal, T., et al. (2019). Ozone-primed neutrophils promote early steps of tumour cell metastasis to lungs by enhancing their NET production. *Thorax* 74, 768–779.

Rodriguez, T.E., Falkowski, N.R., Harkema, J.R., and Huffnagle, G.B. (2007). Role of Neutrophils in Preventing and Resolving Acute Fungal Sinusitis. *Infect. Immun.* 75, 5663–5668.

Roduit, C., Wohlgensinger, J., Frei, R., Bitter, S., Bieli, C., Loeliger, S., Büchele, G., Riedler, J., Dalphin, J.-C., Remes, S., et al. (2011). Prenatal animal contact and gene expression of innate immunity receptors at birth are associated with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 127, 179-185.e1.

Romagnani, S. (2004). Immunologic influences on allergy and the TH1/TH2 balance. *J. Allergy Clin. Immunol.* 113, 395–400.

Rook, G.A.W. (2012). Hygiene Hypothesis and Autoimmune Diseases. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 42, 5–15.

Röschmann K I. L., Luiten S., Jonker M. J., Breit T. M., Fokkens W. J., Petersen A., and van Drunen C. M. (2011). Timothy grass pollen extract-induced gene expression and signalling pathways in airway epithelial cells. *Clin. Exp. Allergy* 41, 830–841.

Rosenthal, L.A., Avila, P.C., Heymann, P.W., Martin, R.J., Miller, E.K., Papadopoulos, N.G., Peebles, R.S., and Gern, J.E. (2010). Viral respiratory tract infections and asthma: The course ahead. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, 1212–1217.

Rudd, C.E., Taylor, A., and Schneider, H. (2009). CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunol. Rev.* 229, 12–26.

Sabatel, C., Radermecker, C., Fievez, L., Paulissen, G., Chakarov, S., Fernandes, C., Olivier, S., Toussaint, M., Pirotin, D., Xiao, X., et al. (2017). Exposure to Bacterial CpG DNA Protects from Airway Allergic Inflammation by Expanding Regulatory Lung Interstitial Macrophages. *Immunity* 46, 457–473.

Sadallah, S., Eken, C., and Schifferli, J.A. (2011). Ectosomes as modulators of inflammation and immunity. *Clin. Exp. Immunol.* *163*, 26–32.

Saghafian-Hedengren, S., Sverremark-Ekström, E., Linde, A., Lilja, G., and Nilsson, C. (2010). Early-life EBV infection protects against persistent IgE sensitization. *J. Allergy Clin. Immunol.* *125*, 433–438.

Sagiv, J.Y., Michaeli, J., Assi, S., Mishalian, I., Kisos, H., Levy, L., Damti, P., Lumbroso, D., Polyansky, L., Sionov, R.V., et al. (2015). Phenotypic Diversity and Plasticity in Circulating Neutrophil Subpopulations in Cancer. *Cell Rep.* *10*, 562–573.

Saitoh, T., Komano, J., Saitoh, Y., Misawa, T., Takahama, M., Kozaki, T., Uehata, T., Iwasaki, H., Omori, H., Yamaoka, S., et al. (2012). Neutrophil Extracellular Traps Mediate a Host Defense Response to Human Immunodeficiency Virus-1. *Cell Host Microbe* *12*, 109–116.

Sangaletti, S., Tripodo, C., Chiodoni, C., Guarnotta, C., Cappetti, B., Casalini, P., Piconese, S., Parenza, M., Guiducci, C., Vitali, C., et al. (2012). Neutrophil extracellular traps mediate transfer of cytoplasmic neutrophil antigens to myeloid dendritic cells toward ANCA induction and associated autoimmunity. *Blood* *120*, 3007–3018.

Santo, C.D., Arscott, R., Booth, S., Karydis, I., Jones, M., Asher, R., Salio, M., Middleton, M., and Cerundolo, V. (2010). Invariant NKT cells modulate the suppressive activity of IL-10-secreting neutrophils differentiated with serum amyloid A. *Nat. Immunol.* *11*, 1039–1046.

Sato, F., Nakazawa, M., Yamamiya, S., Tamura, C., Hongo, N., Hotta, C., and Minami, M. (2009). Effect of BSA Antigen Sensitization during the Acute Phase of Influenza A Viral Infection on CD11c⁺ Pulmonary Antigen Presenting Cells. *Allergol. Int.* *58*, 445–454.

Sbihi, H., Tamburic, L., Koehoorn, M., and Brauer, M. (2016). Perinatal air pollution exposure and development of asthma from birth to age 10 years. *Eur. Respir. J.* *47*, 1062–1071.

Scanlon, S.T., and McKenzie, A.N. (2012). Type 2 innate lymphoid cells: new players in asthma and allergy. *Curr. Opin. Immunol.* *24*, 707–712.

Scapini, P., Bazzoni, F., and Cassatella, M.A. (2008). Regulation of B-cell-activating factor (BAFF)/B lymphocyte stimulator (BLyS) expression in human neutrophils. *Immunol. Lett.* *116*, 1–6.

Scapini, P., Marini, O., Tecchio, C., and Cassatella, M.A. (2016). Human neutrophils in the saga of cellular heterogeneity: insights and open questions. *Immunol. Rev.* 273, 48–60.

Schaub, B., Liu, J., Höppler, S., Schleich, I., Huehn, J., Olek, S., Wieczorek, G., Illi, S., and von Mutius, E. (2009). Maternal farm exposure modulates neonatal immune mechanisms through regulatory T cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* 123, 774–782.e5.

Schelegle, E.S., Miller, L.A., Gershwin, L.J., Fanucchi, M.V., Van Winkle, L.S., Gerriets, J.E., Walby, W.F., Mitchell, V., Tarkington, B.K., Wong, V.J., et al. (2003). Repeated episodes of ozone inhalation amplifies the effects of allergen sensitization and inhalation on airway immune and structural development in Rhesus monkeys. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 191, 74–85.

Schleich, F.N., Manise, M., Sele, J., Henket, M., Seidel, L., and Louis, R. (2013). Distribution of sputum cellular phenotype in a large asthma cohort: predicting factors for eosinophilic vs neutrophilic inflammation. *BMC Pulm. Med.* 13, 11.

Schorf, C., Janko, C., Latzko, M., Chaurio, R., Schett, G., and Herrmann, M. (2012). Monosodium urate crystals induce extracellular DNA traps in neutrophils, eosinophils, and basophils but not in mononuclear cells. *Front. Immunol.* 3.

Schuijs, M.J., Willart, M.A., Vergote, K., Gras, D., Deswarte, K., Ege, M.J., Madeira, F.B., Beyaert, R., Loo, G. van, Bracher, F., et al. (2015). Farm dust and endotoxin protect against allergy through A20 induction in lung epithelial cells. *Science* 349, 1106–1110.

Segal, A.W. (2005). How Neutrophils Kill Microbes. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 197–223.

Sengeløv, H., Kjeldsen, L., and Borregaard, N. (1993). Control of exocytosis in early neutrophil activation. *J. Immunol.* 150, 1535–1543.

Sevin, C.M., Newcomb, D.C., Toki, S., Han, W., Sherrill, T.P., Boswell, M.G., Zhu, Z., Collins, R.D., Boyd, K.L., Goleniewska, K., et al. (2013). Deficiency of gp91phox Inhibits Allergic Airway Inflammation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 49, 396–402.

Shao, M.X.G., and Nadel, J.A. (2005). Neutrophil Elastase Induces MUC5AC Mucin Production in Human Airway Epithelial Cells via a Cascade Involving Protein Kinase C, Reactive Oxygen Species, and TNF- α -Converting Enzyme. *J. Immunol.* 175, 4009–4016.

Sharkhuu, T., Doerfler, D.L., Copeland, C., Luebke, R.W., and Gilmour, M.I. (2011). Effect of maternal exposure to ozone on reproductive outcome and immune, inflammatory, and allergic responses in the offspring. *J. Immunotoxicol.* 8, 183–194.

Sheshachalam, A., Srivastava, N., Mitchell, T., Lacy, P., and Eitzen, G. (2014). Granule Protein Processing and Regulated Secretion in Neutrophils. *Front. Immunol.* 5.

Shi, J., Gilbert, G.E., Kokubo, Y., and Ohashi, T. (2001). Role of the liver in regulating numbers of circulating neutrophils. *Blood* 98, 1226–1230.

Shin, M.R., Kang, S.K., Kim, Y.S., Lee, S.Y., Hong, S.C., and Kim, E.-C. (2015). TNF- α and LPS activate angiogenesis via VEGF and SIRT1 signalling in human dental pulp cells. *Int. Endod. J.* 48, 705–716.

Sigua, J.A., Buelow, B., Cheung, D.S., Buell, E., Hunter, D., Klancnik, M., and Grayson, M.H. (2014). CD49d-expressing neutrophils differentiate atopic from nonatopic individuals. *J. Allergy Clin. Immunol.* 133, 901-904.e5.

Sigurs, N., Aljassim, F., Kjellman, B., Robinson, P.D., Sigurbergsson, F., Bjarnason, R., and Gustafsson, P.M. (2010). Asthma and allergy patterns over 18 years after severe RSV bronchiolitis in the first year of life. *Thorax* 65, 1045–1052.

Silvestri, M., Oddera, S., Sacco, O., Balbo, A., Crimi, E., and Rossi, G.A. (1997). Bronchial and Bronchoalveolar Inflammation in Single Early and Dual Responders after Allergen Inhalation Challenge. *Lung* 175, 277–285.

Simoes, E.A.F., Groothuis, J.R., Carbonell-Estrany, X., Rieger, C.H.L., Mitchell, I., Fredrick, L.M., and Kimpen, J.L.L. (2007). Palivizumab Prophylaxis, Respiratory Syncytial Virus, and Subsequent Recurrent Wheezing. *J. Pediatr.* 151, 34-42.e1.

Skendros, P., Mitroulis, I., and Ritis, K. (2018). Autophagy in Neutrophils: From Granulopoiesis to Neutrophil Extracellular Traps. *Front. Cell Dev. Biol.* 6.

Sly, P.D., Kusel, M., and Holt, P.G. (2010). Do early-life viral infections cause asthma? *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, 1202–1205.

Smits, H.H., Everts, B., Hartgers, F.C., and Yazdanbakhsh, M. (2010). Chronic Helminth Infections Protect Against Allergic Diseases by Active Regulatory Processes. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 10, 3–12.

Söderberg, D., and Segelmark, M. (2016). Neutrophil Extracellular Traps in ANCA-Associated Vasculitis. *Front. Immunol.* 7.

Song, E., Jaishankar, G.B., Saleh, H., Jithpratuck, W., Sahni, R., and Krishnaswamy, G. (2011). Chronic granulomatous disease: a review of the infectious and inflammatory complications. *Clin. Mol. Allergy* 9, 10.

Sozańska, B., Błaszczyk, M., Pearce, N., and Cullinan, P. (2014). Atopy and allergic respiratory disease in rural Poland before and after accession to the European Union. *J. Allergy Clin. Immunol.* 133, 1347–1353.

Stackowicz, J., Jönsson, F., and Reber, L. (2020). Mouse Models and Tools for the in vivo Study of Neutrophils. *Front. Immunol.* 10, 3130.

Stark, M.A., Huo, Y., Burcin, T.L., Morris, M.A., Olson, T.S., and Ley, K. (2005). Phagocytosis of Apoptotic Neutrophils Regulates Granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity* 22, 285–294.

Stein, M.M., Hrusch, C.L., Gozdz, J., Igartua, C., Pivniouk, V., Murray, S.E., Ledford, J.G., Marques dos Santos, M., Anderson, R.L., Metwali, N., et al. (2016). Innate Immunity and Asthma Risk in Amish and Hutterite Farm Children. *N. Engl. J. Med.* 375, 411–421.

Stephens, R., Randolph, D.A., Huang, G., Holtzman, M.J., and Chaplin, D.D. (2002). Antigen-Nonspecific Recruitment of Th2 Cells to the Lung as a Mechanism for Viral Infection-Induced Allergic Asthma. *J. Immunol.* 169, 5458–5467.

Strachan, D.P. (1989). Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 299, 1259–1260.

van Strien, R.T., Engel, R., Holst, O., Bufer, A., Eder, W., Waser, M., Braun-Fahrlander, C., Riedler, J., Nowak, D., von Mutius, E., et al. (2004). Microbial exposure of rural school children, as assessed by levels of N-acetyl-muramic acid in mattress dust, and its association with respiratory health. *J. Allergy Clin. Immunol.* 113, 860–867.

Stuart, L.M., and Ezekowitz, R.A.B. (2005). Phagocytosis: Elegant Complexity. *Immunity* 22, 539–550.

Sumagin, R., Brazil, J.C., Nava, P., Nishio, H., Alam, A., Luissint, A.C., Weber, D.A., Neish, A.S., Nusrat, A., and Parkos, C.A. (2016). Neutrophil interactions with epithelial-expressed ICAM-1 enhances intestinal mucosal wound healing. *Mucosal Immunol.* 9, 1151–1162.

Sumitomo, M., Nishikawa, M., Fukuda, T., Kaneko, T., Ikeda, H., Suzuki, S., and Okubo, T. (1990). Effects of Ozone Exposure on Experimental Asthma in Guinea Pigs Sensitized with Ovalbumin through the Airway. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 93, 139–147.

Summers, C., Rankin, S.M., Condliffe, A.M., Singh, N., Peters, A.M., and Chilvers, E.R. (2010). Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol.* 31, 318–324.

Summers, C., Singh, N.R., White, J.F., Mackenzie, I.M., Johnston, A., Solanki, C., Balan, K.K., Peters, A.M., and Chilvers, E.R. (2014). Pulmonary retention of primed neutrophils: a novel protective host response, which is impaired in the acute respiratory distress syndrome. *Thorax* 69, 623–629.

Suratt, B.T., Young, S.K., Lieber, J., Nick, J.A., Henson, P.M., and Worthen, G.S. (2001). Neutrophil maturation and activation determine anatomic site of clearance from circulation. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* 281, L913–L921.

Suzukawa, M., Morita, H., Nambu, A., Arae, K., Shimura, E., Shibui, A., Yamaguchi, S., Suzukawa, K., Nakanishi, W., Oboki, K., et al. (2012). Epithelial Cell-Derived IL-25, but Not Th17 Cell-Derived IL-17 or IL-17F, Is Crucial for Murine Asthma. *J. Immunol.* 1200461.

Suzuki, S., Suzuki, Y., Yamamoto, N., Matsumoto, Y., Shirai, A., and Okubo, T. (1998). Influenza A virus infection increases IgE production and airway responsiveness in aerosolized antigen-exposed mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* 102, 732–740.

Taichman, N.S., Young, S., Cruchley, A.T., Taylor, P., and Paleolog, E. (1997). Human neutrophils secrete vascular endothelial growth factor. *J. Leukoc. Biol.* 62, 397–400.

Takashima, A., and Yao, Y. (2015). Neutrophil plasticity: acquisition of phenotype and functionality of antigen-presenting cell. *J. Leukoc. Biol.* 98, 489–496.

Tang, H., Cao, W., Kasturi, S.P., Ravindran, R., Nakaya, H.I., Kundu, K., Murthy, N., Kepler, T.B., Malissen, B., and Pulendran, B. (2010). The T helper type 2 response to cysteine proteases requires dendritic cell–basophil cooperation via ROS-mediated signaling. *Nat. Immunol.* 11, 608–617.

Tate, M.D., Brooks, A.G., and Reading, P.C. (2008). The role of neutrophils in the upper and lower respiratory tract during influenza virus infection of mice. *Respir. Res.* 9, 57.

Tate, M.D., Ioannidis, L.J., Croker, B., Brown, L.E., Brooks, A.G., and Reading, P.C. (2011). The Role of Neutrophils during Mild and Severe Influenza Virus Infections of Mice. *PLOS ONE* 6, e17618.

Taube, C., Dakhama, A., Rha, Y.-H., Takeda, K., Joetham, A., Park, J.-W., Balhorn, A., Takai, T., Poch, K.R., Nick, J.A., et al. (2003). Transient Neutrophil Infiltration After Allergen Challenge Is Dependent on Specific Antibodies and FcγIII Receptors. *J. Immunol.* 170, 4301–4309.

Tétreault Louis-Francois, Doucet Marieve, Gamache Philippe, Fournier Michel, Brand Allan, Kosatsky Tom, and Smargiassi Audrey (2016). Childhood Exposure to Ambient Air Pollutants and the Onset of Asthma: An Administrative Cohort Study in Québec. *Environ. Health Perspect.* 124, 1276–1282.

Tillack, K., Breiden, P., Martin, R., and Sospedra, M. (2012). T Lymphocyte Priming by Neutrophil Extracellular Traps Links Innate and Adaptive Immune Responses. *J. Immunol.* 188, 3150–3159.

To, T., Stanojevic, S., Moores, G., Gershon, A.S., Bateman, E.D., Cruz, A.A., and Boulet, L.-P. (2012). Global asthma prevalence in adults: findings from the cross-sectional world health survey. *BMC Public Health* 12, 204.

Toussaint, M., Jackson, D.J., Swieboda, D., Guedán, A., Tsourouksoglou, T.-D., Ching, Y.M., Radermecker, C., Makrinioti, H., Aniscenko, J., Bartlett, N.W., et al. (2017). Host DNA released by NETosis promotes rhinovirus-induced type-2 allergic asthma exacerbation. *Nat. Med.* 23, 681–691.

Traves, S.L., Smith, S.J., Barnes, P.J., and Donnelly, L.E. (2004). Specific CXC but not CC chemokines cause elevated monocyte migration in COPD: a role for CXCR2. *J. Leukoc. Biol.* 76, 441–450.

Tripathi, S., Tecele, T., Verma, A., Crouch, E., White, M., and Hartshorn, K.L. (2013). The human cathelicidin LL-37 inhibits influenza A viruses through a mechanism distinct from that of surfactant protein D or defensins. *J. Gen. Virol.* 94, 40–49.

Trompette, A., Divanovic, S., Visintin, A., Blanchard, C., Hegde, R.S., Madan, R., Thorne, P.S., Wills-Karp, M., Gioannini, T.L., Weiss, J.P., et al. (2009). Allergenicity resulting from functional mimicry of a Toll-like receptor complex protein. *Nature* 457, 585–588.

Trompette, A., Gollwitzer, E.S., Yadava, K., Sichelstiel, A.K., Sprenger, N., Ngom-Bru, C., Blanchard, C., Junt, T., Nicod, L.P., Harris, N.L., et al. (2014). Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nat. Med.* 20, 159–166.

Tsitoura, D.C., Kim, S., Dabbagh, K., Berry, G., Lewis, D.B., and Umetsu, D.T. (2000). Respiratory Infection with Influenza A Virus Interferes with the Induction of Tolerance to Aeroallergens. *J. Immunol.* 165, 3484–3491.

Tsuda, Y., Takahashi, H., Kobayashi, M., Hanafusa, T., Herndon, D.N., and Suzuki, F. (2004). Three Different Neutrophil Subsets Exhibited in Mice with Different Susceptibilities to Infection by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Immunity* 21, 215–226.

Tumpey, T.M., Chen, S.H., Oakes, J.E., and Lausch, R.N. (1996). Neutrophil-mediated suppression of virus replication after herpes simplex virus type 1 infection of the murine cornea. *J. Virol.* 70, 898–904.

Turbica, I., Gallais, Y., Gueguen, C., Tharinger, H., Al Sabbagh, C., Gorges, R., Gary-Gouy, H., Kerdine-Römer, S., Pallardy, M., Mascarell, L., et al. (2015). Ectosomes from neutrophil-like cells down-regulate nickel-induced dendritic cell maturation and promote Th2 polarization. *J. Leukoc. Biol.* 97, 737–749.

Tuthill, T.J., Papadopoulos, N.G., Jourdan, P., Challinor, L.J., Sharp, N.A., Plumpton, C., Shah, K., Barnard, S., Dash, L., Burnet, J., et al. (2003). Mouse respiratory epithelial cells support efficient replication of human rhinovirus. *J. Gen. Virol.* 84, 2829–2836.

Uhl, B., Vadlau, Y., Zuchtriegel, G., Nekolla, K., Sharaf, K., Gaertner, F., Massberg, S., Krombach, F., and Reichel, C.A. (2016). Aged neutrophils contribute to the first line of defense in the acute inflammatory response. *Blood* 128, 2327–2337.

Urban, C.F., Reichard, U., Brinkmann, V., and Zychlinsky, A. (2006). Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell. Microbiol.* 8, 668–676.

Urban, C.F., Ermert, D., Schmid, M., Abu-Abed, U., Goosmann, C., Nacken, W., Brinkmann, V., Jungblut, P.R., and Zychlinsky, A. (2009). Neutrophil Extracellular Traps Contain Calprotectin, a

Cytosolic Protein Complex Involved in Host Defense against *Candida albicans*. *PLOS Pathog.* 5, e1000639.

Ussov, W.Y., Aktolun, C., Myers, M.J., Jamar, F., and Peters, A.M. (1995). Granulocyte margination in bone marrow: comparison with margination in the spleen and liver. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 55, 87–96.

Velazquez, C., Shibayama-Salas, M., Aguirre-Garcia, J., Tsutsumi, V., and Calderon, J. (1998). Role of neutrophils in innate resistance to *Entamoeba histolytica* liver infection in mice. *Parasite Immunol.* 20, 255–262.

Veldhoen, M., Uyttenhove, C., van Snick, J., Helmby, H., Westendorf, A., Buer, J., Martin, B., Wilhelm, C., and Stockinger, B. (2008). Transforming growth factor- β “reprograms” the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9–producing subset. *Nat. Immunol.* 9, 1341–1346.

Venge, Byström, Carlson, Håkansson, Karawacjzyk, Peterson, Sevéus, and Trulsson (1999). Eosinophil cationic protein (ECP): molecular and biological properties and the use of ECP as a marker of eosinophil activation in disease. *Clin. Exp. Allergy* 29, 1172–1186.

Ventura, I., Vega, A., Chacón, P., Chamorro, C., Aroca, R., Gómez, E., Bellido, V., Puente, Y., Blanca, M., and Monteseirín, J. (2014). Neutrophils from allergic asthmatic patients produce and release metalloproteinase-9 upon direct exposure to allergens. *Allergy* 69, 898–905.

Vercelli, D. (2006). Mechanisms of the hygiene hypothesis — molecular and otherwise. *Curr. Opin. Immunol.* 18, 733–737.

Vercelli, D. (2008). Discovering susceptibility genes for asthma and allergy. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 169–182.

Vermaelen, K.Y., Cataldo, D., Tournoy, K., Maes, T., Dhulst, A., Louis, R., Foidart, J.-M., Noël, A., and Pauwels, R. (2003). Matrix Metalloproteinase-9-Mediated Dendritic Cell Recruitment into the Airways Is a Critical Step in a Mouse Model of Asthma. *J. Immunol.* 171, 1016–1022.

Verri, W.A., Souto, F.O., Vieira, S.M., Almeida, S.C.L., Fukada, S.Y., Xu, D., Alves-Filho, J.C., Cunha, T.M., Guerrero, A.T.G., Mattos-Guimaraes, R.B., et al. (2010). IL-33 induces neutrophil migration in rheumatoid arthritis and is a target of anti-TNF therapy. *Ann. Rheum. Dis.* 69, 1697–1703.

Villanueva, E., Yalavarthi, S., Berthier, C.C., Hodgins, J.B., Khandpur, R., Lin, A.M., Rubin, C.J., Zhao, W., Olsen, S.H., Klinker, M., et al. (2011). Netting Neutrophils Induce Endothelial Damage, Infiltrate Tissues, and Expose Immunostimulatory Molecules in Systemic Lupus Erythematosus. *J. Immunol.* 187, 538–552.

Vogt, K.L., Summers, C., Chilvers, E.R., and Condliffe, A.M. (2018). Priming and de-priming of neutrophil responses in vitro and in vivo. *Eur. J. Clin. Invest.* 48, e12967.

Voynow, J.A., Fischer, B.M., Malarkey, D.E., Burch, L.H., Wong, T., Longphre, M., Ho, S.B., and Foster, W.M. (2004). Neutrophil elastase induces mucus cell metaplasia in mouse lung. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* 287, L1293–L1302.

Wang, J., Hossain, M., Thanabalasuriar, A., Gunzer, M., Meininger, C., and Kubes, P. (2017). Visualizing the function and fate of neutrophils in sterile injury and repair. *Science* 358, 111–116.

Wang, J.P., Bowen, G.N., Padden, C., Cerny, A., Finberg, R.W., Newburger, P.E., and Kurt-Jones, E.A. (2008). Toll-like receptor-mediated activation of neutrophils by influenza A virus. *Blood* 112, 2028–2034.

Warnatsch, A., Ioannou, M., Wang, Q., and Papayannopoulos, V. (2015). Neutrophil extracellular traps license macrophages and Th17 cells for cytokine production in atherosclerosis. *Science* 349, 316–320.

Watz, H., Uddin, M., Pedersen, F., Kirsten, A., Goldmann, T., Stellmacher, F., Groth, E., Larsson, B., Böttcher, G., Malmgren, A., et al. (2017). Effects of the CXCR2 antagonist AZD5069 on lung neutrophil recruitment in asthma. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 45, 121–123.

Wenzel, S.E. (2006). Asthma: defining of the persistent adult phenotypes. *The Lancet* 368, 804–813.

Wenzel, S.E. (2012). Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nat. Med.* 18, 716–725.

Wenzel, S.E., Trudeau, J.B., Kaminsky, D.A., Cohn, J., Martin, R.J., and Westcott, J.Y. (1995). Effect of 5-lipoxygenase inhibition on bronchoconstriction and airway inflammation in nocturnal asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 152, 897–905.

White, M.J.V., Chinea, L.E., Pilling, D., and Gomer, R.H. (2018). Protease activated-receptor 2 is necessary for neutrophil chemorepulsion induced by trypsin, tryptase, or dipeptidyl peptidase IV. *J. Leukoc. Biol.* *103*, 119–128.

Wiegman, C.H., Li, F., Clarke, C.J., Jazrawi, E., Kirkham, P., Barnes, P.J., Adcock, I.M., and Chung, K.F. (2014). A comprehensive analysis of oxidative stress in the ozone-induced lung inflammation mouse model. *Clin. Sci.* *126*, 425–440.

Williams, A.S., Leung, S.-Y., Nath, P., Khorasani, N.M., Bhavsar, P., Issa, R., Mitchell, J.A., Adcock, I.M., and Chung, K.F. (2007). Role of TLR2, TLR4, and MyD88 in murine ozone-induced airway hyperresponsiveness and neutrophilia. *J. Appl. Physiol.* *103*, 1189–1195.

Witter, A.R., Okunnu, B.M., and Berg, R.E. (2016). The Essential Role of Neutrophils during Infection with the Intracellular Bacterial Pathogen *Listeria monocytogenes*. *J. Immunol.* *197*, 1557–1565.

Wohlleben, G., Müller, J., Tatsch, U., Hambrecht, C., Herz, U., Renz, H., Schmitt, E., Moll, H., and Erb, K.J. (2003). Influenza A Virus Infection Inhibits the Efficient Recruitment of Th2 Cells into the Airways and the Development of Airway Eosinophilia. *J. Immunol.* *170*, 4601–4611.

Wolterink, R.G.J.K., KleinJan, A., Nimwegen, M. van, Bergen, I., Bruijn, M. de, Levani, Y., and Hendriks, R.W. (2012). Pulmonary innate lymphoid cells are major producers of IL-5 and IL-13 in murine models of allergic asthma. *Eur. J. Immunol.* *42*, 1106–1116.

Worbs, T., Hammerschmidt, S.I., and Förster, R. (2017). Dendritic cell migration in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* *17*, 30–48.

Woytschak, J., Keller, N., Krieg, C., Impellizzieri, D., Thompson, R.W., Wynn, T.A., Zinkernagel, A.S., and Boyman, O. (2016). Type 2 Interleukin-4 Receptor Signaling in Neutrophils Antagonizes Their Expansion and Migration during Infection and Inflammation. *Immunity* *45*, 172–184.

Wright, H.L., Moots, R.J., and Edwards, S.W. (2014). The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* *10*, 593–601.

Wu, P., Dupont, W.D., Griffin, M.R., Carroll, K.N., Mitchel, E.F., Gebretsadik, T., and Hartert, T.V. (2008). Evidence of a Causal Role of Winter Virus Infection during Infancy in Early Childhood Asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *178*, 1123–1129.

Xiong, H., Dolpady, J., Wabl, M., Lafaille, M.A.C. de, and Lafaille, J.J. (2012). Sequential class switching is required for the generation of high affinity IgE antibodies. *J. Exp. Med.* 209, 353–364.

Xu, Y., Jagannath, C., Liu, X.-D., Sharafkhaneh, A., Kolodziejska, K.E., and Eissa, N.T. (2007). Toll-like Receptor 4 Is a Sensor for Autophagy Associated with Innate Immunity. *Immunity* 27, 135–144.

Yamamoto, N., Suzuki, S., Shirai, A., Suzuki, M., Nakazawa, M., Nagashima, Y., and Okubo, T. (2000). Dendritic cells are associated with augmentation of antigen sensitization by influenza A virus infection in mice. *Eur. J. Immunol.* 30, 316–326.

Yamamoto, N., Suzuki, S., Suzuki, Y., Shirai, A., Nakazawa, M., Suzuki, M., Takamasu, T., Nagashima, Y., Minami, M., and Ishigatsubo, Y. (2001). Immune Response Induced by Airway Sensitization after Influenza A Virus Infection Depends on Timing of Antigen Exposure in Mice. *J. Virol.* 75, 499–505.

Yang, H., Biermann, M.H., Brauner, J.M., Liu, Y., Zhao, Y., and Herrmann, M. (2016a). New Insights into Neutrophil Extracellular Traps: Mechanisms of Formation and Role in Inflammation. *Front. Immunol.* 7, 302.

Yang, Q., Ge, M.Q., Kokalari, B., Redai, I.G., Wang, X., Kemeny, D.M., Bhandoola, A., and Haczku, A. (2016b). Group 2 innate lymphoid cells mediate ozone-induced airway inflammation and hyperresponsiveness in mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* 137, 571–578.

Yasui, K., Kobayashi, N., Yamazaki, T., Koike, K., Fukushima, K., Taniuchi, S., and Kobayashi, Y. (2005). Neutrophilic inflammation in childhood bronchial asthma. *Thorax* 60, 704–705.

Yazdani, H.O., Chen, H.-W., Tohme, S., Tai, S., van der Windt, D.J., Loughran, P., Rosborough, B.R., Sud, V., Beer-Stolz, D., Turnquist, H.R., et al. (2018). IL-33 exacerbates liver sterile inflammation by amplifying neutrophil extracellular trap formation. *J. Hepatol.* 68, 130–139.

Yipp, B.G., Petri, B., Salina, D., Jenne, C.N., Scott, B.N.V., Zbytnuik, L.D., Pittman, K., Asaduzzaman, M., Wu, K., Meijndert, H.C., et al. (2012). Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat. Med.* 18, 1386–1393.

Yu, S., Kim, H.Y., Chang, Y.-J., DeKruyff, R.H., and Umetsu, D.T. (2014). Innate lymphoid cells and asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 133, 943–950.

Zhang, D., Chen, G., Manwani, D., Mortha, A., Xu, C., Faith, J.J., Burk, R.D., Kunisaki, Y., Jang, J.-E., Scheiermann, C., et al. (2015). Neutrophil ageing is regulated by the microbiome. *Nature* 525, 528–532.

Zhang, X., Majlessi, L., Deriaud, E., Leclerc, C., and Lo-Man, R. (2009). Coactivation of Syk Kinase and MyD88 Adaptor Protein Pathways by Bacteria Promotes Regulatory Properties of Neutrophils. *Immunity* 31, 761–771.

Zhang, Y., Li, L., Liu, Y., and Liu, Z.-R. (2016). PKM2 released by neutrophils at wound site facilitates early wound healing by promoting angiogenesis. *Wound Repair Regen.* 24, 328–336.

Zhou, G., Yu, L., Fang, L., Yang, W., Yu, T., Miao, Y., Chen, M., Wu, K., Chen, F., Cong, Y., et al. (2017). CD177+ neutrophils as functionally activated neutrophils negatively regulate IBD. *Gut* gutjnl-2016-313535.

Zhu, Z., Lee, C.G., Zheng, T., Chupp, G., Wang, J., Homer, R.J., Noble, P.W., Hamid, Q., and Elias, J.A. (2001). Airway Inflammation and Remodeling in Asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164, S67–S70.

Zu, K., Shi, L., Prueitt, R.L., Liu, X., and Goodman, J.E. (2018). Critical review of long-term ozone exposure and asthma development. *Inhal. Toxicol.* 30, 99–113.

Liste des publications

Toussaint, M., Jackson, D. J., Swieboda, D., Guedan, A., Tsourouktsoglou, T.-D., Ching, Y. M., **Radermecker, C.**, Makrinioti, H., Aniscenko, J., Edwards, M. R., Solari, R., Farnir, F., Papayannopoulos, V., Bureau, F.* , Marichal, T.* , & Johnston, S. L.* .(2017). Host DNA released by NETosis promotes rhinovirus-induced type-2 allergic asthma exacerbation. *Nature Medicine*, 23, 681-691.

* Ces auteurs ont contribué de façon équivalente à la publication.

Sabatel, C.* , **Radermecker, C.*** , Fievez, L.* , Paulissen, G., Chakarov, S., Fernandes, C., Olivier, S., Toussaint, M., Pirotin, D., Xiao, X., Quatresooz, P., Sirard, J.-C., Cataldo, D., Gillet, L., Bouabe, H., Desmet, C., Ginhoux, F., Marichal, T.* , & Bureau, F.* .(2017). Exposure to Bacterial CpG DNA Protects from Airway Allergic Inflammation by Expanding Regulatory Lung Interstitial Macrophages. *Immunity*, 46(3), 457-473. (**Annexe 1**)

* Ces auteurs ont contribué de façon équivalente à la publication.

Radermecker, C., Louis, R., Bureau, F., & Marichal, T. (2018). Role of neutrophils in allergic asthma. *Current Opinion in Immunology*, 54, 28-34. (**Annexe 2**)

Rocks, N., Vanwinge, C., **Radermecker, C.**, Blacher, S., Gilles, C., Marée, R., Gillard, A., Evrard, B., Pequeux, C., Marichal, T. , Noël, A., & Cataldo, D. (2019). Ozone-primed neutrophils promote early steps of tumor cell metastasis to lungs by enhancing their NET production. *Thorax*, 0, 1-12

Schyns, J., Bai, Q., Ruscitti, C., **Radermecker, C.**, De Schepper, S., Chakarov, S., Farnir, F., Pirotin, D., Ginhoux, F., Boeckxstaens, G., Bureau, F., & Marichal, T. (2019). Non-classical tissue monocytes and two functionally distinct populations of interstitial macrophages populate the mouse lung. *Nature Communications*, 10(1), 3964.

Radermecker, C.*, Sabatel, C.* , Vanwinge, C., Ruscitti, C., Marechal, P., Perin, F., Schyns, J., Rocks, N., Toussaint, M., Cataldo, D., Johnston, S. L., Bureau, F.* , & Marichal, T.* (2019). Locally instructed CXCR4(hi) neutrophils trigger environment-driven allergic asthma through the release of neutrophil extracellular traps. *Nature Immunology*, 20, 1444-1455

* Ces auteurs ont contribué de façon équivalente à la publication.

El Abbas, S.* , **Radermecker, C.*** , Bai, Q., Beguin, C., Schyns, J., Meunier, M., Pirotin, D., Desmet, C., Meuwis, M.-A., Art, T., Louis, E., Tam, S.-Y., Tsai, M., Bureau, F., Galli, S. J., & Marichal, T. (2019). Epithelial RABGEF1 deficiency promotes intestinal inflammation by dysregulating intrinsic MYD88-dependent innate signaling. *Mucosal Immunology* [Epub ahead of print] (**Annexe 3**)

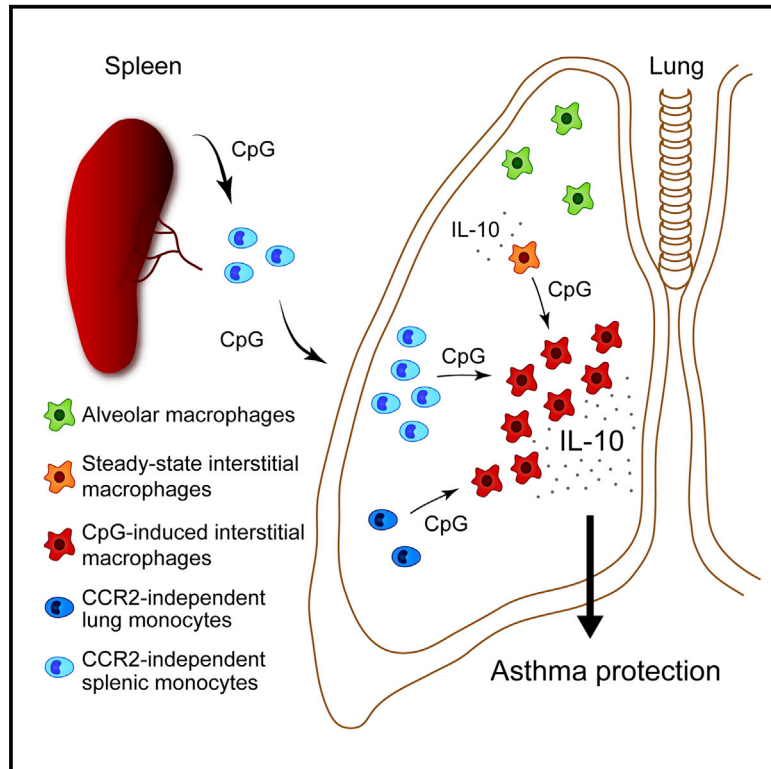
* Ces auteurs ont contribué de façon équivalente à la publication.

Annexes

Immunity

Exposure to Bacterial CpG DNA Protects from Airway Allergic Inflammation by Expanding Regulatory Lung Interstitial Macrophages

Graphical Abstract



Authors

Catherine Sabatel,
Coraline Radermecker,
Laurence Fievez, ..., Florent Ginhoux,
Thomas Marichal, Fabrice Bureau

Correspondence

t.marichal@ulg.ac.be (T.M.),
fabrice.bureau@ulg.ac.be (F.B.)

In Brief

Exposure to unmethylated CpG DNA (CpG) from bacteria is associated with a reduced risk of developing asthma. Sabatel et al. find that CpG exposure leads to higher numbers of lung interstitial macrophages that prevent allergic inflammation through the production of the regulatory cytokine interleukin-10.

Highlights

- Exposure to bacterial CpG DNA (CpG) expands regulatory lung interstitial macrophages (IMs)
- Transfer of WT but not *IL10*^{-/-} IMs protects from allergen-induced airway inflammation
- CpG-induced IMs arise from local and splenic reservoir monocytes
- Migration of regulatory IM precursors to the lung does not require CCR2

Accession Numbers

E-MTAB-5012



Sabatel et al., 2017, Immunity 46, 457–473
March 21, 2017 © 2017 Elsevier Inc.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2017.02.016>

CellPress

Exposure to Bacterial CpG DNA Protects from Airway Allergic Inflammation by Expanding Regulatory Lung Interstitial Macrophages

Catherine Sabatel,^{1,2,11} Coraline Radermecker,^{1,2,11} Laurence Fievez,^{1,11} Genevieve Paulissen,¹ Svetoslav Chakarov,³ Claudia Fernandes,¹ Sabine Olivier,¹ Marie Toussaint,⁴ Dimitri Pirotin,^{1,2} Xue Xiao,^{2,5} Pascale Quatresooz,⁶ Jean-Claude Sirard,⁷ Didier Cataldo,⁸ Laurent Gillet,^{2,5} Hicham Bouabe,⁹ Christophe J. Desmet,¹ Florent Ginhoux,³ Thomas Marichal,^{1,2,*} and Fabrice Bureau^{1,2,10,12,*}

¹Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, GIGA Research, University of Liège, 4000 Liège, Belgium

²Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, 4000 Liège, Belgium

³Singapore Immunology Network, Agency for Science, Technology, and Research, Singapore 138648, Singapore

⁴Airway Disease Infection Section, National Heart and Lung Institute, Imperial College London, London W2 1PG, UK

⁵Laboratory of Immunology-Vaccinology, Fundamental and Applied Research for Animals & Health, University of Liège, 4000 Liège, Belgium

⁶Centre de Recherche sur les Protéines Prion, Department of Human Histology, University of Liège, 4000 Liège, Belgium

⁷INSERM U1019, CNRS UMR 8204, Center for Infection and Immunity of Lille, University of Lille, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, 59000 Lille, France

⁸Laboratory of Tumor and Developmental Biology, GIGA Research, University of Liège, 4000 Liège, Belgium

⁹Laboratory of Lymphocyte Signalling and Development, Babraham Institute, Cambridge CB22 3AT, UK

¹⁰Wallon Excellence in Life Sciences and Biotechnology, Wallonia, Belgium

¹¹Co-first author

¹²Lead Contact

*Correspondence: t.marichal@ulg.ac.be (T.M.), fabrice.bureau@ulg.ac.be (F.B.)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2017.02.016>

SUMMARY

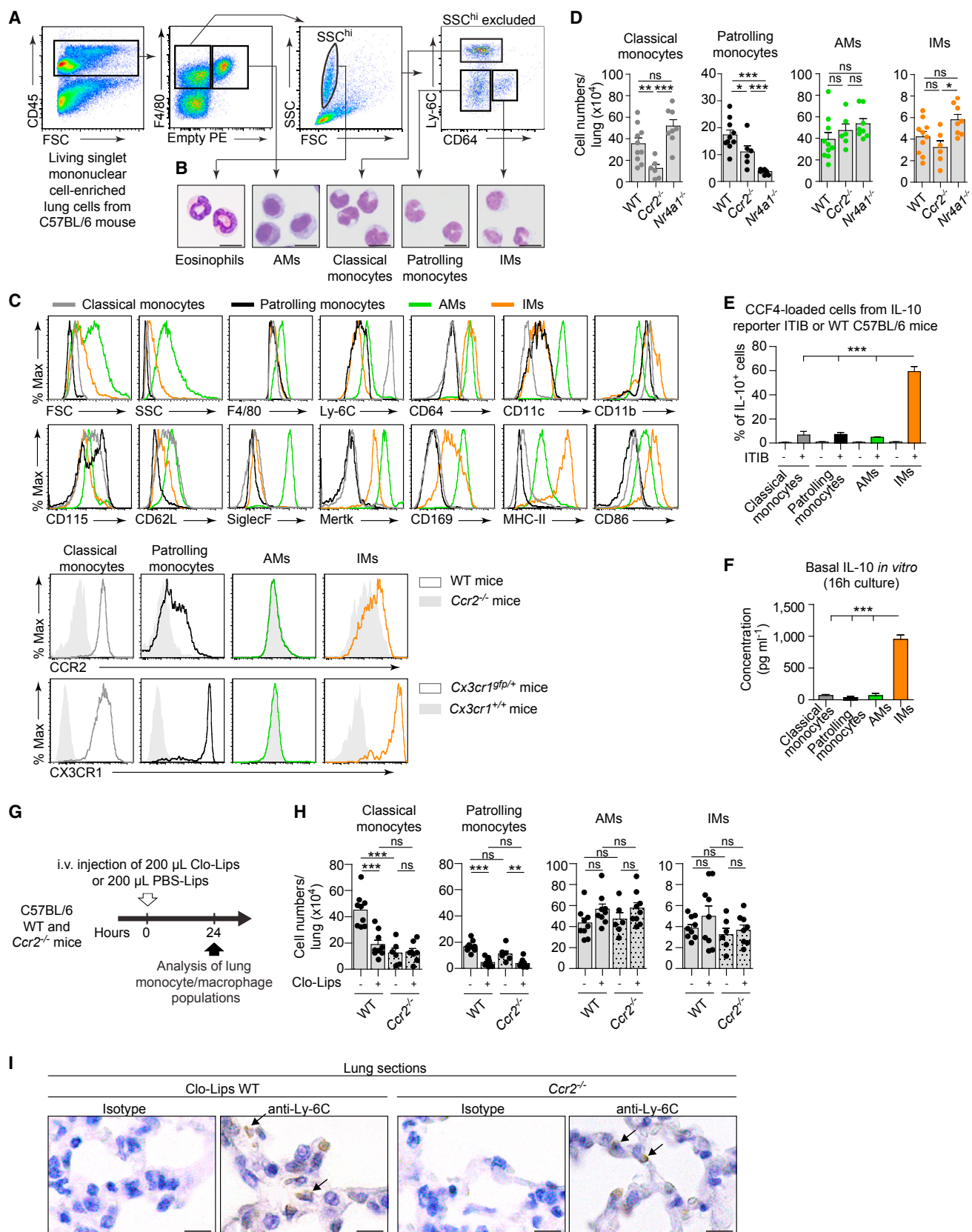
Living in a microbe-rich environment reduces the risk of developing asthma. Exposure of humans or mice to unmethylated CpG DNA (CpG) from bacteria reproduces these protective effects, suggesting a major contribution of CpG to microbe-induced asthma resistance. However, how CpG confers protection remains elusive. We found that exposure to CpG expanded regulatory lung interstitial macrophages (IMs) from monocytes infiltrating the lung or mobilized from the spleen. Trafficking of IM precursors to the lung was independent of CCR2, a chemokine receptor required for monocyte mobilization from the bone marrow. Using a mouse model of allergic airway inflammation, we found that adoptive transfer of IMs isolated from CpG-treated mice recapitulated the protective effects of CpG when administered before allergen sensitization or challenge. IM-mediated protection was dependent on IL-10, given that *Il10*^{−/−} CpG-induced IMs lacked regulatory effects. Thus, the expansion of regulatory lung IMs upon exposure to CpG might underlie the reduced risk of asthma development associated with a microbe-rich environment.

INTRODUCTION

The increased prevalence of allergic asthma over the past few decades points to alterations in the environment (Eder et al.,

2006). The hygiene hypothesis postulates that decreased exposure to environmental and commensal microbes or their products, partly because of changes associated with urban lifestyles, is responsible for this rise (Strachan, 1989; von Mutius, 2016). In line with this hypothesis, epidemiological studies associate growing up on a farm, where exposure to bacterial endotoxin (lipopolysaccharide [LPS]) is high, with reduced risk of allergic sensitization (Braun-Fahrlander et al., 2002; von Mutius, 2016). However, whether LPS mediates the aforementioned protective effects is uncertain. Indeed, concurrent studies in non-rural environments have suggested that exposure to LPS is instead a risk factor for increased asthma prevalence and severity (Thorne et al., 2005). Moreover, although LPS has demonstrated protective effects in some animal models (Schuijs et al., 2015), it has also been shown to promote experimental asthma (Eisenbarth et al., 2002; Hammad et al., 2009).

Another candidate for mediating the protective effects of microbe-rich environments is bacterial DNA, which contains unmethylated CpG motifs with immunomodulatory properties (Krieg, 2006). Bacterial DNA, like LPS, is present in high amounts in dust from rural homes (Roy et al., 2003), and treatment with synthetic CpG DNA (CpG) consistently prevents allergic sensitization in animal models (Kline et al., 1998; Sur et al., 1999). Moreover, CpG is able to reverse established asthma in animals (Broide et al., 1998; Kline et al., 2002) and has shown efficacy in attenuating allergic disorders in human clinical trials (Beeh et al., 2013; Creticos et al., 2006; Krieg, 2006). How CpG exerts these immunomodulatory effects remains unclear. It was initially proposed that CpG, which is often co-administered with allergens, redirects allergen-specific T helper 2 (Th2) cell responses toward Th1 or regulatory T cell responses (Broide et al., 1998; Kline et al., 2002; Kline et al., 1998; Krieg, 2012). However,



(legend on next page)

CpG is capable of conferring protection in the absence of allergens (Beeh et al., 2013; Broide et al., 1998; Krieg, 2012), suggesting that it acts independently of the adaptive immune system.

In 2009, we identified a small population of regulatory macrophages in the lung interstitium of mice (Bedoret et al., 2009). These lung interstitial macrophages (IMs), also found in humans (Hoppstädter et al., 2010), spontaneously produce the immunosuppressive cytokine interleukin-10 (IL-10), a hallmark of regulatory macrophages (Mosser and Edwards, 2008). Moreover, when exposed to low doses of LPS, IMs, which are located in the vicinity of lung dendritic cells (DCs), can counteract the capacity of LPS-activated DCs to induce Th2 responses against harmless antigens (Bedoret et al., 2009). In agreement with this, mice lacking functional IMs, but not wild-type (WT) mice, develop overt asthmatic reactions when exposed to low doses of a mixture of allergen and LPS (Bedoret et al., 2009). However, the immunosuppressive effects of IMs are overwhelmed when the airways are exposed to high levels of allergens and LPS, given that 100% of WT mice develop asthma upon exposure to high doses of house dust mite (HDM) extracts, a phenomenon that requires Toll-like receptor 4 (TLR4) activation by HDM-borne LPS (Hammad et al., 2009). We therefore reasoned that pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) other than LPS could improve the immunosuppressive effects of IMs and thereby explain how a microbe-rich environment reduces the risk of asthma development.

Here, we found that CpG is able to robustly expand the IM population. CpG-induced IMs (CpG IMs) developed from local and splenic reservoir monocytes and were able, by producing IL-10, to confer protection against allergic inflammation even when mice were sensitized and challenged with high doses of HDM. Our findings reveal a role for regulatory IMs shed in the protective effect of CpG exposure in allergic airway inflammation and suggest that similar mechanisms might underlie the reduced risk of human asthma development that is associated with exposure to a microbe-rich environment.

RESULTS

A Simplified Flow Cytometry Strategy Discriminates Lung Monocyte and Macrophage Subsets in Mice

In order to identify the monocyte and macrophage populations associated with the lung at steady state, we set up a simplified six-step, five-color flow cytometry staining procedure on mono-

nuclear-cell-enriched lung cells isolated from whole, non-lavaged, perfused lungs of naive C57BL/6 WT mice. To encompass all monocyte and macrophage populations, we gated sequentially on living singlet cells (step 1), CD45⁺ immune cells (step 2), and cells positive for the pan-monocyte and -macrophage marker F4/80 (step 3) (Figure 1A). Alveolar macrophages (AMs), the most abundant lung phagocytic cells present in the airways (Figure S1A), were identified as large (FSC^{hi}) autofluorescent CD11c^{hi}SiglecF^{hi}CD64⁺Mertk⁺CD169⁺ cells (step 4) (Figures 1A–1C). F4/80-expressing lung-resident eosinophils (Mesnil et al., 2016) were excluded on the basis of their high granularity (SSC^{hi}) (step 5). The remaining CD45⁺F4/80⁺ cells were further separated into three populations according to their expression of the monocyte and macrophage markers Ly-6C (Geissmann et al., 2003) and CD64 (Gautier et al., 2012) (step 6) (Figures 1A and 1B).

Ly-6C^{hi}CD64^{lo} cells were classical monocytes, given that they exhibited a monocytic morphology, expressed the typical markers of classical monocytes (Ly-6C^{hi}CCR2⁺CX3CR1^{int}CD62L⁺), and were less abundant in *Ccr2*^{−/−} mice (Figure 1B–1D), in which classical monocyte emigration from the bone marrow (BM) is compromised (Serbina and Pamer, 2006). Ly-6C^{lo}CD64^{lo} cells also displayed a monocytic morphology, expressed the characteristic markers of patrolling monocytes (Ly-6C^{lo}CCR2^{lo}CX3CR1^{hi}CD62L[−]), and were significantly reduced in mice lacking NR4A1 (Figure 1B–1D), a transcription factor controlling differentiation and survival of patrolling monocytes (Hanna et al., 2011), demonstrating that these cells were patrolling monocytes.

Finally, Ly-6C^{lo}CD64^{hi} cells were identified as IMs. Indeed, these cells were absent in the broncho-alveolar lavage fluid (BALF) (Figure S1A) and were positive for MHC-II and the macrophage markers Mertk and CD169 (Figure 1C). IMs were already present after birth (Figure S1B), expressed low levels of CCR2, and were found in similar numbers in 6- to 10-week-old *Ccr2*^{−/−}, *Nr4a1*^{−/−}, and WT mice (Figure 1D). However, their numbers were significantly lower in 1-year-old *Ccr2*^{−/−} mice than in age-matched controls (Figure S1C), suggesting that IMs represent a heterogeneous population and are partially maintained by classical monocytes in adults, as reported by others (Tan and Krasnow, 2016). To test this, we sutured CD45.1⁺ WT and CD45.2⁺ *Ccr2*^{−/−} mice together for 6 months and analyzed the enrichment in WT partner cells within the *Ccr2*^{−/−} host (Figure S1D). Parabiotic mice efficiently exchanged their circulation, as attested by the percentage of enrichment in blood B cells that

Figure 1. Identification of Monocyte and Macrophage Populations in the Mouse Lung

- (A) Gating strategy.
 (B) Photographs of FACS-sorted populations gated in (A).
 (C and D) Surface phenotype (C) and absolute numbers (D) of the indicated populations in the lungs of WT (C and D), *Ccr2*^{−/−} (D), and *Nr4a1*^{−/−} (D) mice.
 (E) Percentage of IL-10⁺ cells within the cell populations as assessed by detection of 450 nm fluorescence (blue product) in CCF4-substrate-loaded cells isolated from IL-10-β-lactamase reporter IT1B or WT mice.
 (F) Basal IL-10 concentration in culture supernatants of primary cell culture.
 (G) Experimental outline for data in (H).
 (H) Absolute numbers of the indicated populations in the lungs of WT and *Ccr2*^{−/−} mice treated with i.v. PBS-Lips or Clo-Lips.
 (I) Representative anti-Ly-6C immunostainings of lung sections from Clo-Lip-treated WT mice and *Ccr2*^{−/−} mice.

Data in (A)–(C) and (I) represent one of at least six mice from at least three independent experiments. Data in (D) and (H) show the mean + SEM pooled from three independent experiments (n = 6–10 per group). Data in (E) and (F) show the mean + SEM from one of three independent experiments (n = 3–4 per group). p values were calculated with a one-way (D–F) or two-way (H) ANOVA followed by Tukey's post hoc tests (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; ns, not significant). Scale bars, 10 μm. See also Figure S1 for additional information regarding the phenotype, localization, and IL-10 production by lung monocytes and macrophages.

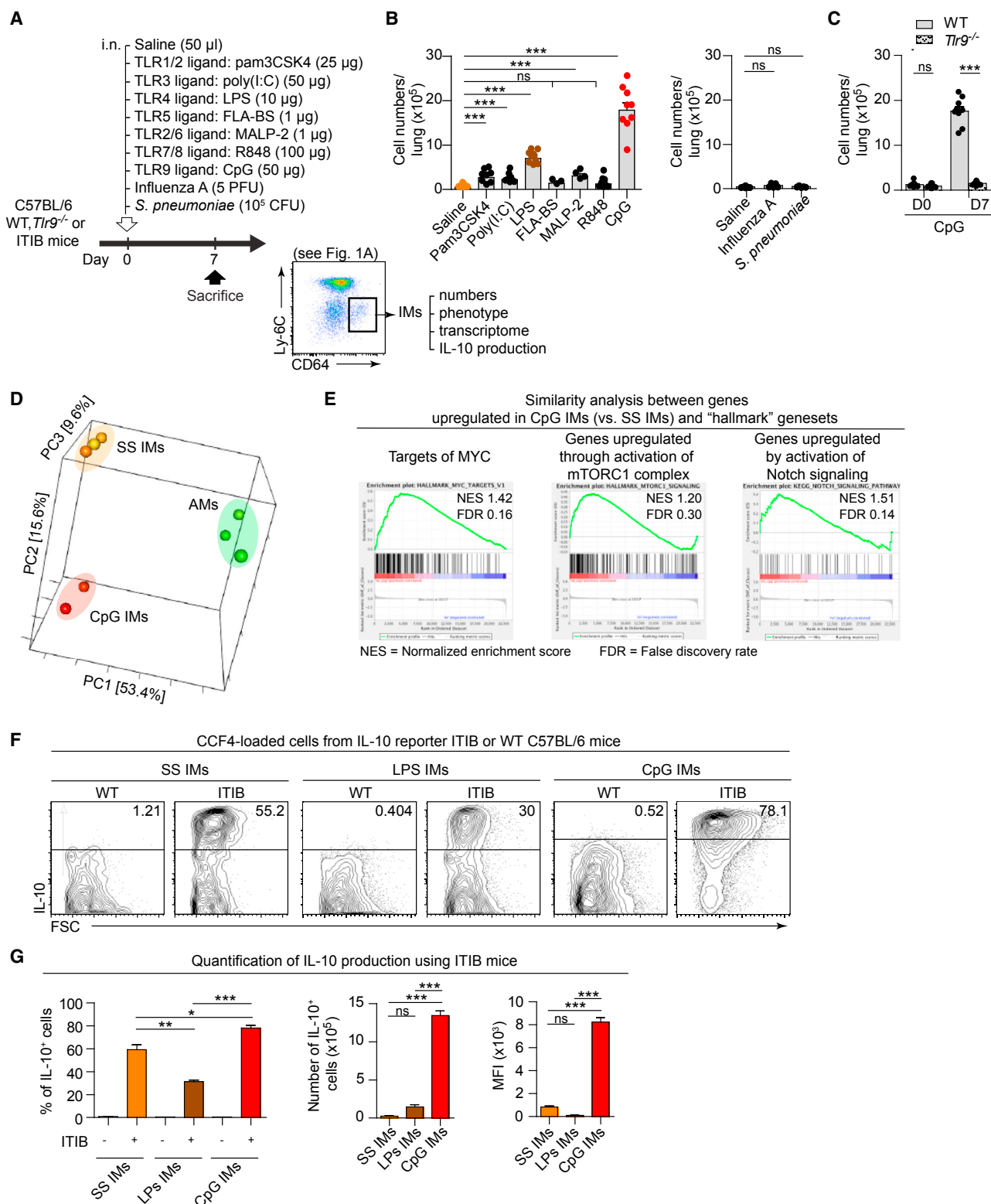


Figure 2. TLR9-Dependent Expansion of IL-10-Producing IMs upon Intranasal CpG Treatment

(A) Experimental outline.

(B and C) Absolute numbers of IMs in the lungs of WT mice 7 days after i.n. stimulation with the indicated TLR ligands or i.n. infection with influenza A or *S. pneumoniae* (B) and *Tlr9*^{-/-} and control mice before and 7 days after i.n. injection of CpG (C). Data show mean + SEM and are pooled from three independent experiments (n = 6–12 per group).

(legend continued on next page)

reached 50%. Conversely, because CCR2 is required for the egress of classical monocytes from the BM, WT monocytes constituted more than 90% of the monocytes present in the blood of *Ccr2*^{-/-} mice. Lung AMs were not enriched in WT cells, confirming that AMs can self-renew by local proliferation at steady state (Hashimoto et al., 2013). However, 35% of the IM pool was constituted by WT partner cells after 6 months of parabiosis, strongly supporting that IMs are, at least in part, replenished by circulating blood monocytes in adults, a feature shared with gut macrophages (Bain et al., 2014).

IMs constitutively expressed IL-10, as quantified in vivo by the use of IL-10- β -lactamase reporter ITIB mice (Bouabe et al., 2011) and ex vivo by ELISA (Figures 1E and 1F; Figure S1E). Notably, a spontaneous IM-derived IL-10 production was dependent on the adaptor molecule MYD88 but independent of TLR9 (Figure S1F), concordant with the fact that LPS, which mediates signaling through MYD88, sustains IM-derived IL-10 at steady state (Bedoret et al., 2009). Upon CpG or LPS stimulation, the increased ability of IMs to produce IL-10 relied on TLR9 and MyD88 or only MyD88, respectively (Figure S1F).

When applied to the lungs during HDM-induced airway allergy, the flow cytometry strategy identified similar cell populations (Figure S1G).

To determine which cells were truly located in the lung tissue, we depleted blood-vessel-associated monocytes and macrophages by injecting clodronate-containing liposomes (Clo-Lips) intravenously 24 hr before analysis (Figure 1G). This regimen had no effect on AMs or IMs but efficiently depleted patrolling monocytes and a substantial part ($\approx 60\%$) of Ly-6C^{hi} monocytes (Figure 1H), showing that most monocytes, except some Ly-6C^{hi} monocytes, were associated with the lung vasculature. Concordant with this, combined in vivo and ex vivo anti-CD45 stainings confirmed that AMs, IMs, and only a fraction of Ly-6C^{hi} monocytes were truly located in the lungs of WT mice (Figures S1H and S1I). Anti-Ly-6C immunostaining of lung sections from Clo-Lip-treated WT and *Ccr2*^{-/-} mice confirmed that the Ly-6C⁺ cells were located in the lung parenchyma (Figure 1I). Notably, in *Ccr2*^{-/-} mice, Clo-Lip injection did not affect the amount of Ly-6C^{hi} monocytes, whose numbers and localization were similar to those from Clo-Lip-treated WT mice (Figures 1H and 1I), indicating that these monocytes established in the lung independently of CCR2. In the following sections, we refer to these CCR2-independent, lung-infiltrating monocytes, which were already present at the age of 3 days (Figure S1J), as lung monocytes. To assess whether lung monocytes represented a monocyte population distinct from classical CCR2-dependent blood monocytes, we performed a transcriptomic comparison of Ly-6C^{hi} monocytes recovered from perfused lung of WT mice ($\approx 60\%$ of CCR2-dependent classical blood monocytes

and $\approx 40\%$ of lung monocytes) and *Ccr2*^{-/-} mice (more than 95% of lung monocytes). This analysis revealed only one differentially expressed gene, namely *Ccr2* (Figures S1K and S1L), showing that lung monocytes fully corresponded to classical Ly-6C^{hi} monocytes.

CpG Induces TLR9-Dependent IM Expansion

We hypothesized that exposure to certain PAMPs, such as LPS or CpG, might protect against asthma by enhancing the immunosuppressive potential of IMs. First, we confirmed expression of most TLRs on IMs (Figure S2A) and assessed how local exposure to PAMPs, especially TLR ligands, or a local infection would quantitatively affect IMs (Figure 2A; Figure S2B). Although several PAMPs, including LPS, were able to significantly expand IMs, CpG was by far the most potent in increasing IM numbers 1 week after a single intranasal (i.n.) exposure (42.5-fold with an average of 1.7×10^6 cells) (Figure 2B; Figure S2C), a phenomenon that was dependent on signaling through TLR9 (Figure 2C). Such expansion persisted up to 8 weeks after treatment, was also observed to a lesser extent when CpG was administered by a systemic route, and was associated with the presence of a small fraction of CpG IMs into the BALF (Figures S2D–S2G). Conversely, pulmonary infection with *Influenza A virus* (PR8) or *Streptococcus pneumoniae* did not have any significant effect on IM numbers 7 days after infection (Figure 2B). Of note, AM counts remained unchanged after CpG treatment and were moderately increased after LPS treatment (Figures S2H and S2I).

We compared gene expression profiles between CpG IMs and steady-state IMs (SS IMs). Principal-component analysis (PCA) revealed that CpG IMs clustered more closely with SS IMs than with AMs (Figure 2D), but 285 genes were differentially regulated between CpG IMs and SS IMs (fold change > 2 , $p < 0.01$). Among genes upregulated in CpG IMs, gene-set enrichment analysis (GSEA) revealed a significant enrichment of genes implicated in macrophage activation and differentiation, such as targets of c-MYC (Aziz et al., 2009) or genes upregulated by activation of mTORC1 or NOTCH signaling (Covarrubias et al., 2016; Monsalve et al., 2009) (Figure 2E).

Protein expression of several surface markers was comparable between CpG IMs and SS IMs, except for CD11b and CD115, which were upregulated in CpG IMs, and for CD62L, SiglecF, and CD169, which were downregulated (Figure S2J).

Functionally, in comparison with SS IMs, CpG IMs exhibited a hypersuppressive profile. Indeed, the percentage of IL-10⁺ cells within CpG IMs was increased, leading to a 55-fold increase in the numbers of IL-10-producing IMs upon CpG treatment (Figures 2F and 2G). Furthermore, the level of IL-10 expression within CpG IMs was substantially greater than that in SS IMs (Figures 2F and 2G), leading to a global 550-fold increase in

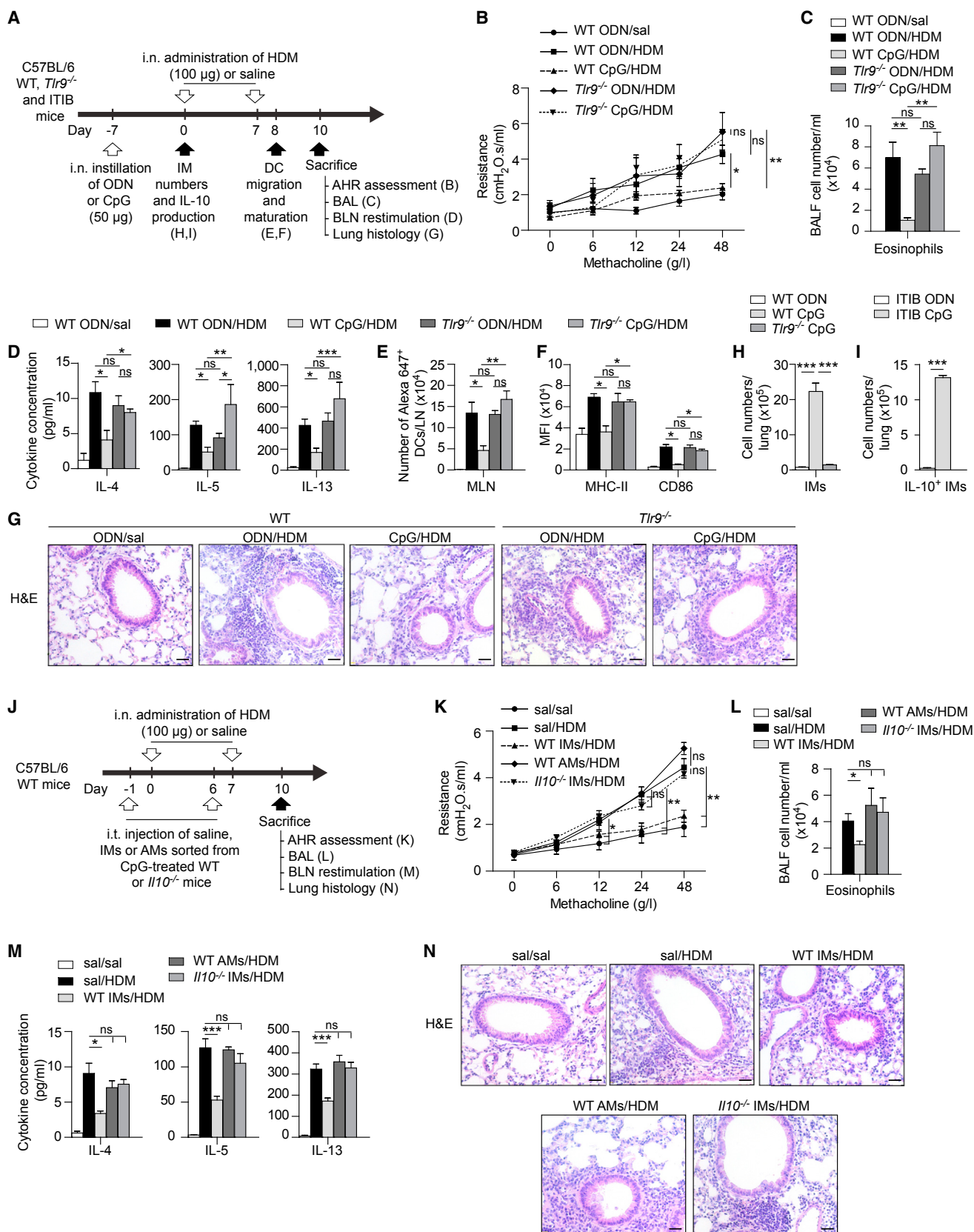
(D) PCA comparing SS IMs, CpG IMs, and AMs. Percentages indicate the variability explained by each component.

(E) GSEA between CpG IMs and defined gene sets.

(F) Density plots showing IL-10 expression of IMs as assessed by detection of 450 nm fluorescence (blue product) in CCF4-substrate-loaded cells isolated from IL-10- β -lactamase reporter ITIB or WT mice. Numbers indicate the percentage of IL-10⁺ cells within the population, quantified in (G).

(G) Percentages (left), numbers (middle), and geometric mean fluorescence intensity (MFI, right) of IL-10⁺ cells within the cell populations. Data show the mean \pm SEM and represent one of two independent experiments ($n = 3$ –4 per group).

p values were calculated with a one-way (B and G) or two-way (C) ANOVA followed by Tukey's post hoc tests (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns, not significant). Abbreviations: D, day; PFU, plaque-forming units; and CFU, colony-forming units. See also Figure S2 for additional information regarding IM numbers, localization, phenotype, and AM numbers.



(legend on next page)

the amount of IM-derived IL-10 expressed in the lungs after CpG treatment. LPS stimulation did not promote such an enhanced suppressive profile (Figures 2F and 2G).

All together, our data show that IMs specifically expanded in response to CpG exposure and that CpG IMs acquired distinct transcriptomic, phenotypic, and functional features.

CpG-Induced IMs Prevent Allergic Sensitization to Inhaled Allergens

We wondered whether the hypersuppressive profile of CpG IMs might contribute to the protective effects of CpG on asthmatic sensitization. First, we developed a mouse model of asthma prevention by CpG, during which WT mice were intranasally exposed to CpG 7 days before two weekly i.n. instillations of 100 μ g HDM (Figure 3A). This regimen of HDM exposure bypassed the regulatory functions of SS IMs, given that 100% of HDM-exposed WT mice developed airway hyperreactivity (AHR), BALF eosinophilia, HDM-specific lymph node (LN) Th2 responses, peribronchial inflammation, and increased mucus production, as well as increased activation of lung DCs and enhanced DC migration to the LNs (Figures 3B–3G; Figures S3A and S3B). In this model, CpG pre-exposure promoted robust expansion of IL-10-producing CpG IMs (Figures 3H and 3I) and protected WT mice, but not *Tlr9*^{−/−} mice, from HDM-induced asthmatic features and DC activation (Figures 3B–3G; Figures S3A and S3B).

Second, to test whether CpG IMs were sufficient to confer such protection, we performed adoptive-transfer experiments (Figure 3J). AHR, eosinophilia, HDM-specific Th2 responses, lung inflammation, and mucus production were significantly reduced when CpG IMs sorted from lungs of CpG-treated WT mice were transferred before HDM exposures (Figures 3K–3N; Figures S3C and S3D). Such protection was specific to CpG IMs and relied on CpG-IM-derived IL-10, given that transfer of WT AMs or *Il10*^{−/−} CpG IMs failed to improve the characteristic features of asthma (Figures 3J–3N; Figures S3C and S3D).

These results demonstrate that IL-10-producing IMs were essential for the protective effects of CpG against sensitization to inhaled allergens.

CpG-Induced IMs Mediate the Immunotherapeutic Effects of CpG on Established Asthma

CpG has already proven its efficacy in attenuating established asthma in animal models and in human clinical trials. Here, we developed a model of immunotherapy based on CpG treatment of HDM-sensitized WT mice before HDM challenge (Figure 4A).

CpG was more potent in expanding IL-10-producing CpG IMs and in decreasing AHR, eosinophilic inflammation, HDM-spe-

cific Th2 responses, mucus production, and DC activation than in sham-treated asthmatic counterparts, features that were not observed in *Tlr9*^{−/−} mice (Figures 4B–4I; Figures S4A and S4B). Moreover, CpG IMs were sufficient to confer protection, given that adoptive transfer of CpG IMs before HDM challenge markedly decreased airway allergy in HDM-sensitized mice, an effect that was not observed when WT AMs or *Il10*^{−/−} CpG IMs were transferred (Figures 4J–4N; Figures S4C and S4D). Importantly, the expansion of IL-10-producing IMs and the immunotherapeutic effects of CpG persisted up to 8 weeks after CpG treatment (Figures S4E–S4L). Moreover, similar CpG-induced IM-mediated protection was observed in an asthma model based on systemic sensitization with ovalbumin and alum (Figures S4M–S4Q).

CpG Expands IMs Mainly from CCR2-Independent Monocytes

Given the crucial contribution of CpG IMs to asthma prevention and treatment in our models, we sought to determine the origin of these macrophages. In adult tissues, macrophages are maintained or expanded by local proliferation or differentiation from CCR2-dependent BM-derived classical monocytes (Ginhoux and Guilliams, 2016).

First, to assess the proliferative ability of IMs, we analyzed the incorporation of EdU by IMs after CpG treatment. CpG exposure did not increase the percentage of EdU⁺ IMs at the time points analyzed, providing no support for local proliferation of IMs after CpG treatment (Figure 5A).

Second, we quantified the numbers of CpG IMs in *Ccr2*^{−/−} mice. Surprisingly, CpG IM numbers were only slightly decreased in *Ccr2*^{−/−} mice (Figure 5B), whereas LPS IM numbers were robustly reduced (Figure S5A), supporting the idea that CpG IMs, unlike LPS IMs, developed mostly from monocytes that were recruited independently of the BM. To test this, we used mixed BM competitive CD45.1/2 chimeras engrafted with CD45.1⁺ WT and CD45.2⁺ *Ccr2*^{−/−} BM cells (Figure 5C). 8 weeks after reconstitution, >85% of blood Ly-6C^{hi} monocytes were of CD45.1⁺ WT origin, whereas B lymphocytes and neutrophils had a 1:1 ratio of CD45.1⁺ WT to CD45.2⁺ *Ccr2*^{−/−} cells (Figures 5D and 5E). 8 and 12 weeks after reconstitution, the numbers of lung AMs and IMs were comparable with those before irradiation (Figures S5B and S5C) and originated mainly from CD45.1⁺ WT donor cells, showing that the depleted niches were repopulated by CCR2-dependent classical monocytes after irradiation (Figures 5D–5F). 7 days after CpG treatment, BM-competitive chimeras exhibited increased IM numbers (Figures S5B and S5C), and this expansion was associated with a drastic enrichment of CD45.2⁺ *Ccr2*^{−/−} donor

Figure 3. Contribution of CpG IMs to the Prevention of Experimental Asthma

(A–I) Experimental outline (A), dynamic airway resistance upon methacholine inhalation (B), BALF eosinophil counts (C), cytokine concentrations in culture supernatants of bronchial LN (BLN) cells restimulated with HDM (D), quantification of lung DC migration to the BLN (E) and expression of MHC-II and CD86 at day 8 (F), H&E staining of lung sections (G), and numbers of CpG IMs (H) and IL-10⁺ CpG IMs (I) at day 0.

(J–N) Experimental outline (J), dynamic airway resistance upon methacholine inhalation (K), BALF eosinophil counts (L), cytokine concentrations in culture supernatants of BLN cells restimulated with HDM (M), and H&E staining of lung sections (N).

Data show the mean + SEM (B and K) or mean + SEM and are pooled from at least three independent experiments (n = 6–16 per group) (C–F, H, I, L, and M) or represent one of two independent experiments (n = 4 per group) (H and I). p values were calculated with one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc tests (B–F, H, and K–M) or a two-tailed Student's t test (I) (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; ns, not significant). Data in (G) and (N) represent one of at least six mice from at least two independent experiments. Scale bars, 32 μ m. See also Figure S3 for periodic-acid-Schiff (PAS) stainings.

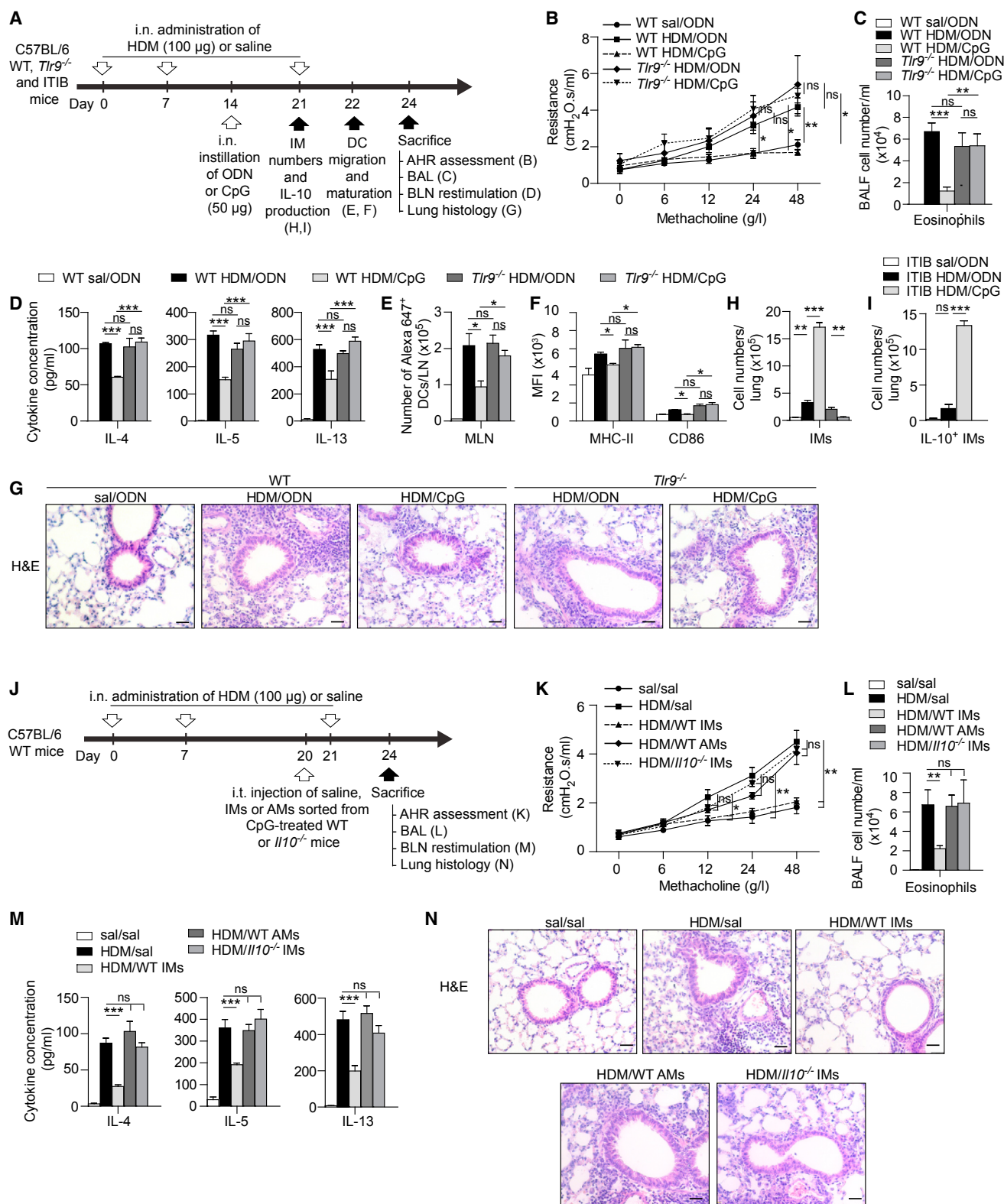


Figure 4. Contribution of CpG IMs to the Treatment of Experimental Asthma

(A–I) Experimental outline (A), dynamic airway resistance upon methacholine inhalation (B), BALF eosinophil counts (C), cytokine concentrations in culture supernatants of BLN cells restimulated with HDM (D), quantification of lung DC migration to the BLN (E) and expression of MHC-II and CD86 at day 22 (F), H&E staining of lung sections (G), and numbers of CpG IMs (H) and IL-10⁺ CpG IMs (I) at day 21.

(legend continued on next page)

cells to the level of that observed in blood B lymphocytes, namely 100% of CCR2 independence when mice were analyzed at 12 weeks of age (Figures 5D–5F). These results demonstrate that CpG IMs mainly arose from CCR2-independent precursors. Notably, when chimeric mice were exposed to LPS, IM chimerism was not substantially affected and was similar to that of blood Ly-6C^{hi} monocytes, demonstrating that LPS IMs arose from BM-derived classical monocytes (Figures S5D and S5E).

All together, these results support that CpG IMs neither expanded through local proliferation nor substantially differentiated from CCR2-dependent BM-derived classical monocytes but instead mainly originated from CCR2-independent cells.

Lung and Splenic Monocytes Are the Precursors of CpG IMs

Earlier in this article, we defined lung monocytes as CCR2-independent classical monocytes infiltrating the lung parenchyma (Figure 6A). Given that IM expansion upon CpG sensing was mainly independent of CCR2, we hypothesized that lung monocytes could act as a local reservoir for CpG IMs.

First, we validated the CCR2 independence of lung monocytes by conducting parabiosis and mixed-BM-chimera experiments. CD45.1⁺ WT and CD45.2⁺ *Ccr2*^{−/−} mice exchanged their circulation for 6 months, and the enrichment of WT and *Ccr2*^{−/−} partner cells within the *Ccr2*^{−/−} and WT hosts, respectively, was analyzed 24 hr after intravenous (i.v.) Clo-Lip treatment (Figure 6B). Notably, for lung monocytes, a comparable enrichment of partner cells was observed in WT and *Ccr2*^{−/−} hosts (Figure 6B), indicating that these cells were continually replenished by circulating cells independently of CCR2. In BM-reconstituted competitive chimeras, lung monocytes were also repopulated with CCR2-independent engrafted cells, consistent with our findings in parabiotic mice (Figures 6C–6E; Figures S6A and S6B).

Our data so far are consistent with the idea that a precursor-product relationship could exist between lung monocytes and CpG IMs. When we analyzed the kinetics of the appearance of CpG IMs in vivo, we observed a differentiation pattern from Ly-6C^{hi}CD64^{lo} to Ly-6C^{lo}CD64^{hi} cells in both WT and *Ccr2*^{−/−} mice (Figure 6F). With the progressive acquisition of CD64 and the subsequent loss of Ly-6C, the Ly-6C/CD64 plot looked like a waterfall (arrows in Figure 6F), suggesting that lung monocytes might give rise to CpG IMs.

Next, we tested whether lung monocytes could respond to CpG and differentiate into IM-like cells ex vivo. Lung monocytes sorted via fluorescence-activated cell sorting (FACS) expressed higher levels of *Tlr9* than did AMs or IMs (Figure 6G) and were able to respond to CpG, as shown by increased phosphorylation of Erk kinase (Häcker et al., 1999) (Figure 6H). Ex vivo CpG treatment of lung monocytes promoted their survival and triggered

the same waterfall over time as in vivo treatment did (Figures 6I and 6J), a phenomenon that was dependent on TLR9 (Figure S6C). Of note, this waterfall was not observed in LPS-stimulated lung monocytes (Figure S6D). Our data thus support that lung monocytes can differentiate into CpG IMs. Nevertheless, the quantity of lung Ly-6C^{hi} cells and CpG IMs 1 and 7 days after CpG treatment, respectively (Figures 6K and 5B), largely exceeded the number of lung monocytes present at steady state (Figure 1H). We thus tested whether such lung monocytes were able to proliferate in situ, but no increase in EdU incorporation was detected 1 day after CpG treatment (Figure 6L; Figure S6E), when their numbers were >10-fold higher than on day 0 in both WT and *Ccr2*^{−/−} mice (Figure 6K). Of note, after LPS treatment, this increased number of Ly-6C^{hi} cells was seen only in WT mice and not in *Ccr2*^{−/−} mice, adding further support to the BM origin of LPS IMs (Figure S6F). These results suggest that, specifically upon CpG stimulation, additional CCR2-independent monocytes were recruited from a distal reservoir and differentiated into CpG IMs.

Interestingly, the spleen has been shown to constitute a reservoir of CCR2-independent monocytes, which were already present in 3-day-old mice (Figure S7A) and which can migrate to inflammatory tissues in an angiotensin II type 1 (AT-1)-receptor-dependent manner (Swirski et al., 2009). Splenic monocytes expressed higher levels of *Tlr9* than did AMs (Figure 7A), and, like for lung monocytes, ex vivo CpG stimulation promoted their survival and differentiation into CpG-IM-like cells (Figure 7B), showing that they can respond to CpG. Notably, 1 day after i.n. CpG treatment, splenic monocyte numbers were significantly decreased, which was associated with an increase in Ly-6C^{hi} monocytes in the lungs of both WT mice and mice lacking AT-1 receptor (*Agtr1a*^{−/−}) (Figures 7C and 7D). To assess the exact contribution of splenic monocytes to the pool of lung monocytes and CpG IMs, we quantified their numbers 1 and 7 days after CpG treatment, respectively, in splenectomized *Ccr2*^{−/−} mice. As shown in Figures 7E and 7F, the pools of lung monocytes and CpG IMs were significantly reduced when the spleen was absent. SS IM numbers were unaffected by splenectomy (Figure 7F). Thus, the spleen constitutes a reservoir of monocytes that can seed the lung independently of angiotensin signaling and differentiate into CpG IMs.

Of note, when injected subcutaneously in *Ccr2*^{−/−} mice, CpG induced recruitment of monocytes not only in the lung but also in other organs such as the heart and liver. However, except in the lung, this was not associated with an increase in macrophage numbers 7 days later. Conversely, i.n. CpG injection in *Ccr2*^{−/−} mice promoted the recruitment of monocytes in the lung, but not in the heart or liver (Figures 7G and 7H). All together, these data suggest that CpG could mobilize CCR2-independent monocytes but that additional lung-specific signals directed their seeding into the lung and their differentiation into regulatory IMs.

(J–N) Experimental outline (J), dynamic airway resistance upon methacholine inhalation (K), BALF eosinophil counts (L), cytokine concentrations in culture supernatants of BLN cells restimulated with HDM (M), and H&E staining of lung sections (N).

Data show the mean + SEM (B and K) or mean + SEM and are pooled from at least three independent experiments (n = 6–16 per group) (C–F, H, I, L, and M) or represent one of two independent experiments (n = 4 per group) (H and I). p values were calculated with one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc tests (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; ns, not significant). Data in (G) and (N) represent one of at least six mice from at least two independent experiments. Scale bars, 32 μm. See also Figure S4 for PAS stainings, the long-term therapeutic model, and the assessment of the protective effects of CpG IMs in an ovalbumin and alum model.

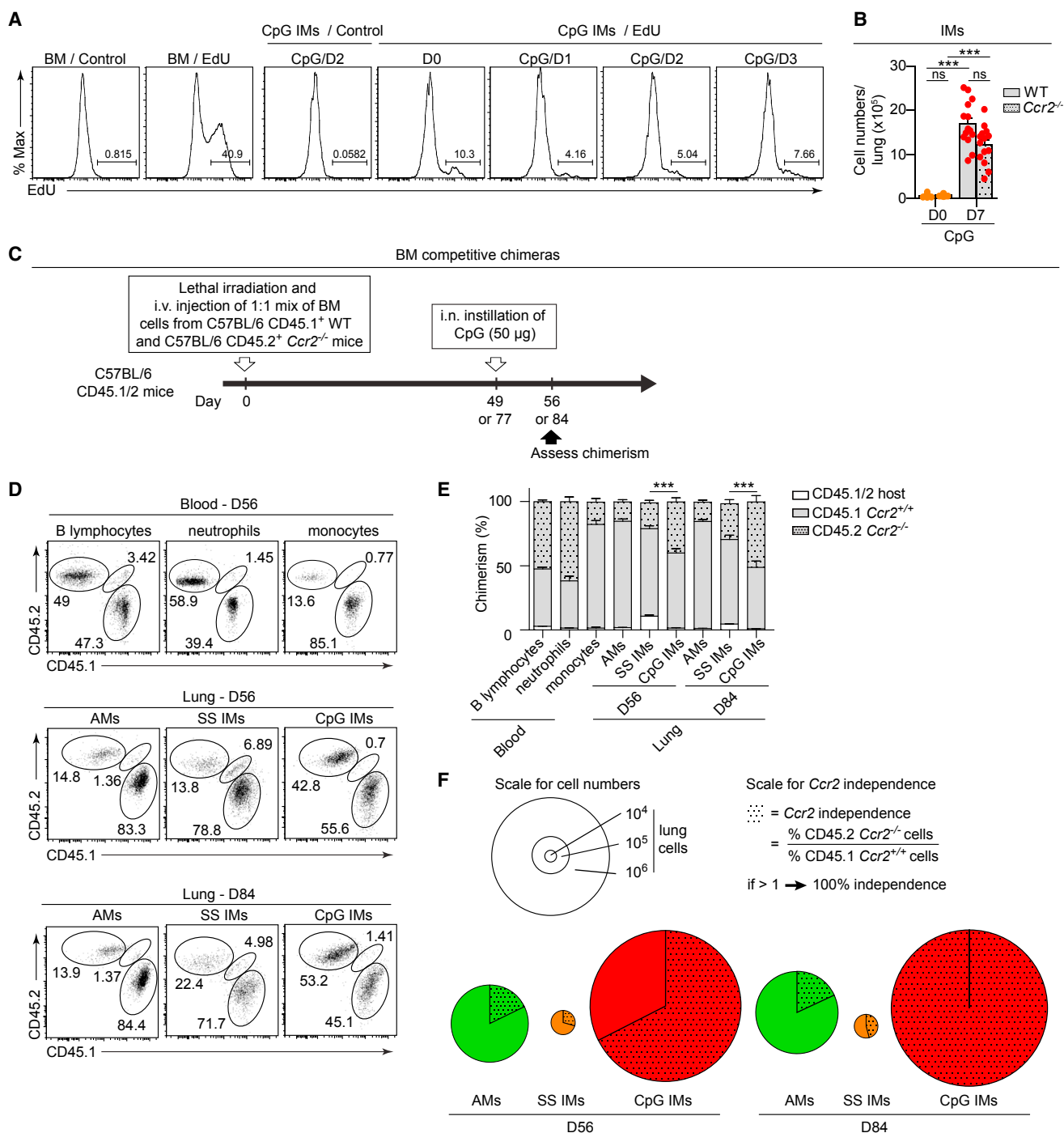


Figure 5. Level of Dependence of CpG IMs on CCR2

(A) IM incorporation of i.p. EdU injection 24 hr before each time point was assessed at day 0 and 1, 2, or 3 days after i.n. CpG treatment of WT mice. BM cells were used as controls. Numbers indicate the percentage of EdU⁺ cells. Results represent one of at least five mice from two independent experiments.

(B) Absolute numbers of IMs in the lungs of WT and *Ccr2*^{-/-} mice before and 7 days after i.n. CpG treatment (50 µg).

(C) Experimental outline for experiments using mixed BM competitive chimeras shown in (D)–(F).

(D) Dot plots showing the percentage of WT and *Ccr2*^{-/-} BM-derived cells and host radio-resistant cells within the indicated populations.

(E) Percentage of BM chimerism and radio-resistance of the indicated populations.

(F) Pie charts depicting the average absolute cell number (surface area) and the CCR2 independence (dotted area) in the indicated cell populations.

(legend continued on next page)

In an attempt to identify the chemokines involved in splenic monocyte recruitment, we performed a chemokine array on lung extracts and found that CpG instillation induced increased levels of several chemokines, an effect that was, however, also observed with LPS (Figures 7I and 7J). Among those chemokines, CCL2 (MCP-1), CCL5 (RANTES), and CCL9 (MIP-1 γ) were not only the most prominent ones but also the ones whose receptors (i.e., CCR2, CCR5, and CCR1, respectively) were the most expressed in Ly-6C^{hi} monocytes (Figures 7I–7K). To assess the potential role of these chemokines, we used neutralizing antibodies *in vivo*. Individual or combined inhibition of CCL2, CCL5, and CCL9, however, did not influence the numbers of lung monocytes in *Ccr2*^{−/−} mice 1 day after CpG treatment (Figures S7B–S7D), suggesting that splenic monocytes were attracted to the lung independently of those signals.

DISCUSSION

We have shown that IMs substantially expanded in response to CpG, which, unlike LPS, has demonstrated consistent anti-allergic effects in humans and animals (Beeh et al., 2013; Broide et al., 1998; Creticos et al., 2006; Krieg, 2006; Sur et al., 1999). Not only were CpG IMs 42 times more numerous than SS IMs, but their overall IL-10 production was also increased 550-fold. This increased regulatory capacity of CpG IMs was associated with protection against asthma sensitization and exacerbation in experimental models in which the suppressive activity of SS IMs was overcome. Using WT mice adoptively transferred with WT or *Il10*^{−/−} CpG IMs and *Tlr9*^{−/−} mice, in which CpG-mediated IM expansion was abolished, we further demonstrated that CpG IMs were not only necessary but also sufficient for mediating the protective effects of CpG through the production of IL-10. Finally, we showed that the number of CpG IMs remained elevated for at least 8 weeks after CpG administration, which, in addition to the fact that CpG has been reported to induce sustained epigenetic modifications in macrophages (Ostuni et al., 2013), could account for the long-lasting innate effects of CpG. Given that SS IMs exert their suppressive activity by inhibiting maturation and migration of lung DCs (Bedoret et al., 2009), which are essential for both development and restimulation of Th2 cells (Lambrecht et al., 2000; van Rijt et al., 2005), and that DC activation was dampened in CpG-treated HDM-challenged mice, we speculate that CpG durably reinforces the ability of IMs to control DC function and, therefore, to break the link between innate and adaptive immunity. This study thus provides a possible mechanism, i.e., induction of hypersuppressive IMs, by which CpG exerts its immunotherapeutic effects in animals and humans and by which exposure to the environmental microbiome, especially to farm dust, which is known to be rich in bacterial DNA (Roy et al., 2003), protects from asthma (Braun-Fahrlander et al., 2002; von Mutius, 2016).

The “mononuclear phagocyte system” model, proposed in 1968 by van Furth and collaborators (van Furth and Cohn,

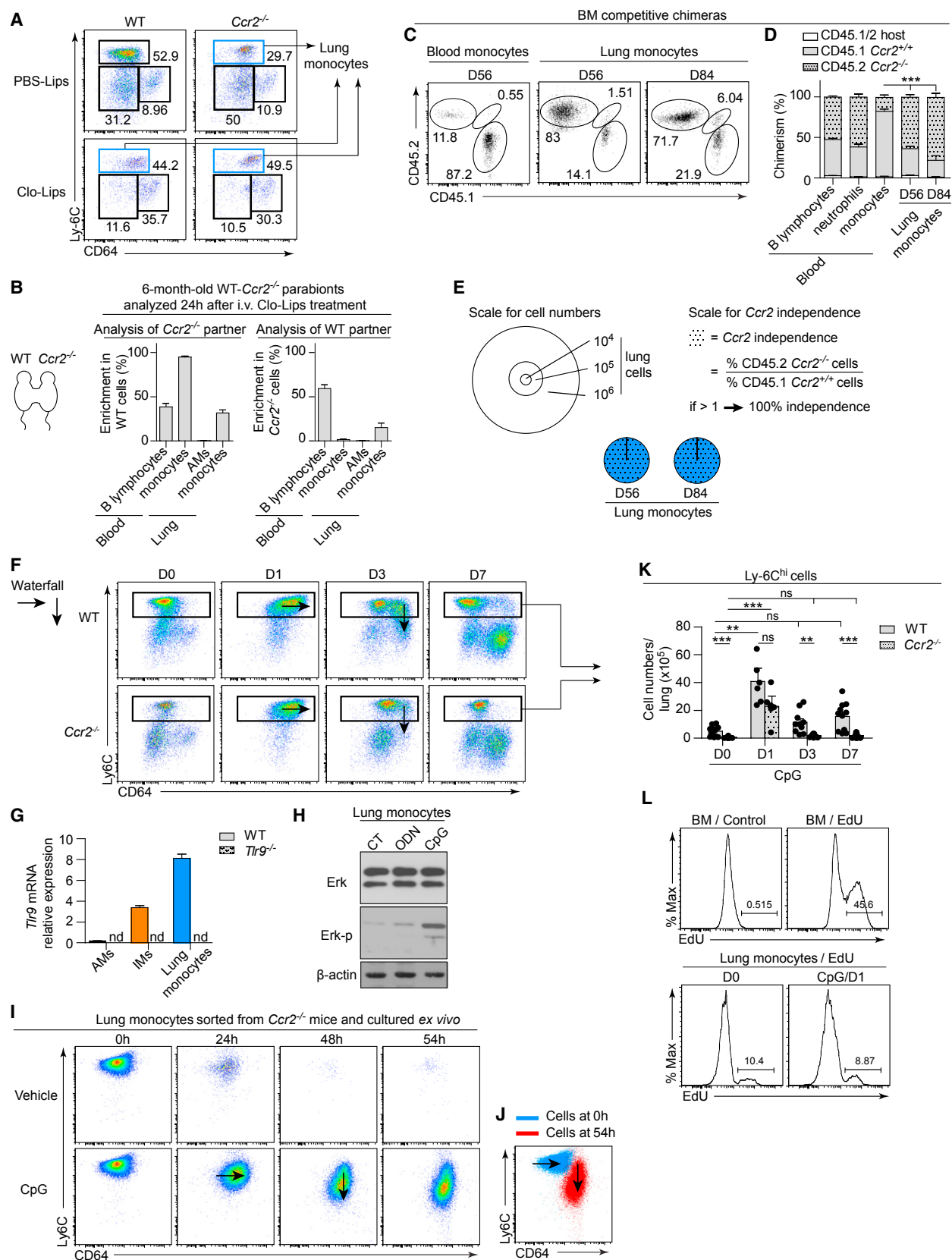
1968), postulates that tissue-resident macrophages are maintained from a constant supply of blood monocytes that extravasate into tissues. However, this model has been challenged by recent studies demonstrating that, under normal conditions, most macrophages arise from embryonic progenitors and self-renew in tissues throughout adulthood (Ginhoux and Guilliams, 2016; Gomez Perdiguero et al., 2015). The only exceptions are gut, dermis, and heart macrophages that, in accordance with the model of van Furth, rely on the constant recruitment of CCR2-dependent classical monocytes to maintain their population (Bain et al., 2014; Epelman et al., 2014; Tamoutounour et al., 2013). Our data from parabiotic mice support that IMs are also, at least in part, maintained by circulating monocytes in adults, as reported recently (Tan and Krasnow, 2016). During inflammation, macrophages expand through the same mechanisms, namely local proliferation and differentiation from recruited CCR2-dependent BM-derived classical monocytes (Davies et al., 2013). Our results from experiments in *Ccr2*^{−/−}, clodronate-treated, chimeric, parabiotic, and splenectomized mice are consistent with an unexpected model in which most CpG IMs can expand from CCR2-independent lung and splenic reservoir monocytes after CpG stimulation. In this model, CpG exerts multiple functions. First, it promotes the mobilization of splenic reservoir monocytes to the lung independently of MCP-1, RANTES, and MIP-1 γ . Second, it triggers differentiation of not only these recruited monocytes but also the herein identified CCR2-independent, lung-infiltrating monocytes into IMs with a hypersuppressive profile.

Noteworthy, CpG and LPS appeared to have distinct effects on the recruitment of monocytes to the lung and their differentiation into suppressive IMs. First, CpG induced a substantial mobilization of monocytes from the spleen (i.e., a CCR2-independent reservoir), whereas LPS mainly triggered mobilization from the BM (i.e., a CCR2-dependent reservoir). Second, CpG acted directly on monocytes *in vitro* to promote their differentiation into macrophages, whereas LPS did not. Third, CpG exposure was able to strikingly increase IM ability to produce IL-10, which was not the case for LPS. Because CpG and LPS are known to act via distinct TLRs, which are expressed at different levels on different structural and immune cells, CpG and LPS most likely induce distinct biological responses in the spleen, BM, lungs, and monocytes themselves, creating a specific microenvironment tailoring IM origin, differentiation, and function.

Given that the numbers of lung reservoir monocytes were identical in WT and *Ccr2*^{−/−} mice, it was tempting to speculate that these cells were different from classical monocytes. However, both cell types had indistinguishable transcriptomes, attesting that lung reservoir monocytes are actually classical monocytes. Although classical monocytes are thought to depend on CCR2 to leave the BM, our results indicate that a fraction of classical monocytes might exit the BM in a CCR2-independent manner to seed the pulmonary and splenic monocyte

(E and F) The percentages of chimerism and of CCR2 independence of blood B lymphocytes, neutrophils (i.e., 50% chimerism and 100% CCR2 independence), and monocytes (i.e., \approx 10% chimerism and \approx 20% CCR2 independence) were used as controls.

Data in (B) and (E) show the mean \pm SEM and are pooled from three independent experiments ($n = 12$ –15 per group). p values were calculated with a two-way (B) or one-way (E) ANOVA followed by Tukey's post hoc tests (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns, not significant). D, day. See also Figure S5 for the CCR2 dependence of LPS IMs and numbers of AMs, SS IMs, LPS IMs, and CpG IMs before irradiation and after BM reconstitution.



(legend on next page)

reservoirs. Identifying the network of chemokine(s) and chemokine receptor(s) orchestrating the traffic of these cells will require additional work.

It has been suggested that the anti-allergic properties of CpG were mediated by plasmacytoid DCs (pDCs), which are known to not only express TLR9 but also play a key role in preventing experimental asthma (de Heer et al., 2004; Krieg, 2006). However, lung pDCs, unlike the other pDC subsets, lack TLR9 expression and therefore cannot account for the role of CpG in regulating lung immune responses (Chen et al., 2006). We have shown here that lung and splenic reservoir monocytes expressed TLR9, which was required for differentiation of CCR2-independent monocytes into IMs after CpG stimulation. Our study thus identifies those reservoir monocytes as the TLR9-expressing cells mediating the immunomodulatory effects of CpG in the lung. Of note, it has been demonstrated that human IMs express TLR9 and are able to increase their production of IL-10 upon bacterial DNA stimulation (Hoppstädter et al., 2010), suggesting that our findings in mice are relevant to humans. Moreover, polymorphisms in the TLR9 promoter region have been associated with an increased risk of asthma development (Lazarus et al., 2003; Smit et al., 2009), supporting the idea that environmental CpG exerts a protective role in humans and that loss of functional TLR9 in human IMs might contribute to asthma development.

In conclusion, our study shows that lung and splenic reservoir monocytes use TLR9 to specifically sense bacterial CpG and massively differentiate into IMs endowed with enhanced anti-allergic properties. These findings are of pathophysiological importance because they provide a possible mechanistic explanation for the hygiene hypothesis and for the protective effects of synthetic CpG in experimental models and human clinical trials. Moreover, they reinforce the idea that therapeutic strategies aimed at ameliorating the inhibitory properties of IMs could help control asthma.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

A full description of the experimental procedures can be found in the [Supplemental Information](#).

Mice

WT, *Cx3cr1*^{GFP/+}, *Ccr2*^{-/-}, *Nr4a1*^{-/-}, *Myd88*^{-/-}, *Il10*^{-/-}, and *Agtr1a*^{-/-} C57BL/6 mice were from the Jackson Laboratory. *Tlr9*^{-/-} and IL-10- β -lactamase reporter (ITIB) mice were generated by others (see [Supplemental Information](#)). All mice were used at 6–10 weeks of age unless otherwise indicated. All experimental procedures and protocols were approved by the local ethics committee. Additional information can be found in the [Supplemental Information](#).

Reagents and Antibodies

Mouse non-CpG DNA (ODN, 5'-GCTTGTGACTCAGCCGGA-3'; reference no. HC4034) and CpG DNA (5'-TCCATGACGTTCTGATGCT-3'; reference no. HC4033) were from Sanbio. HDM extracts (HDM from *Dermatophagoides farinae*) were from Greer Laboratories. Additional reagents and antibodies are described in the [Supplemental Information](#).

Cell Isolation, Staining, and Flow Cytometry

To obtain single-lung-cell suspensions, we perfused lungs with 10 mL of PBS through the right ventricle, cut them into small pieces, and digested them for 1 hr at 37°C in HBSS containing 1 mg/mL collagenase A (Roche) and 0.05 mg/mL DNase I (Roche). We then enriched single-cell suspensions in mononuclear cells by harvesting cells from the 1.080:1.038 g/mL interface with a density gradient (Easycoll from WVR).

Cell phenotyping and sorting were performed on a FACSCANTO II and a FACSARIA III (BD Biosciences), respectively. Additional information can be found in the [Supplemental Information](#).

Vascular Monocyte and Macrophage Depletion

WT or *Ccr2*^{-/-} mice were injected intravenously with 200 μ L of Clo-Lips or empty liposomes (PBS-Lips), and lung cells were harvested 24 hr later.

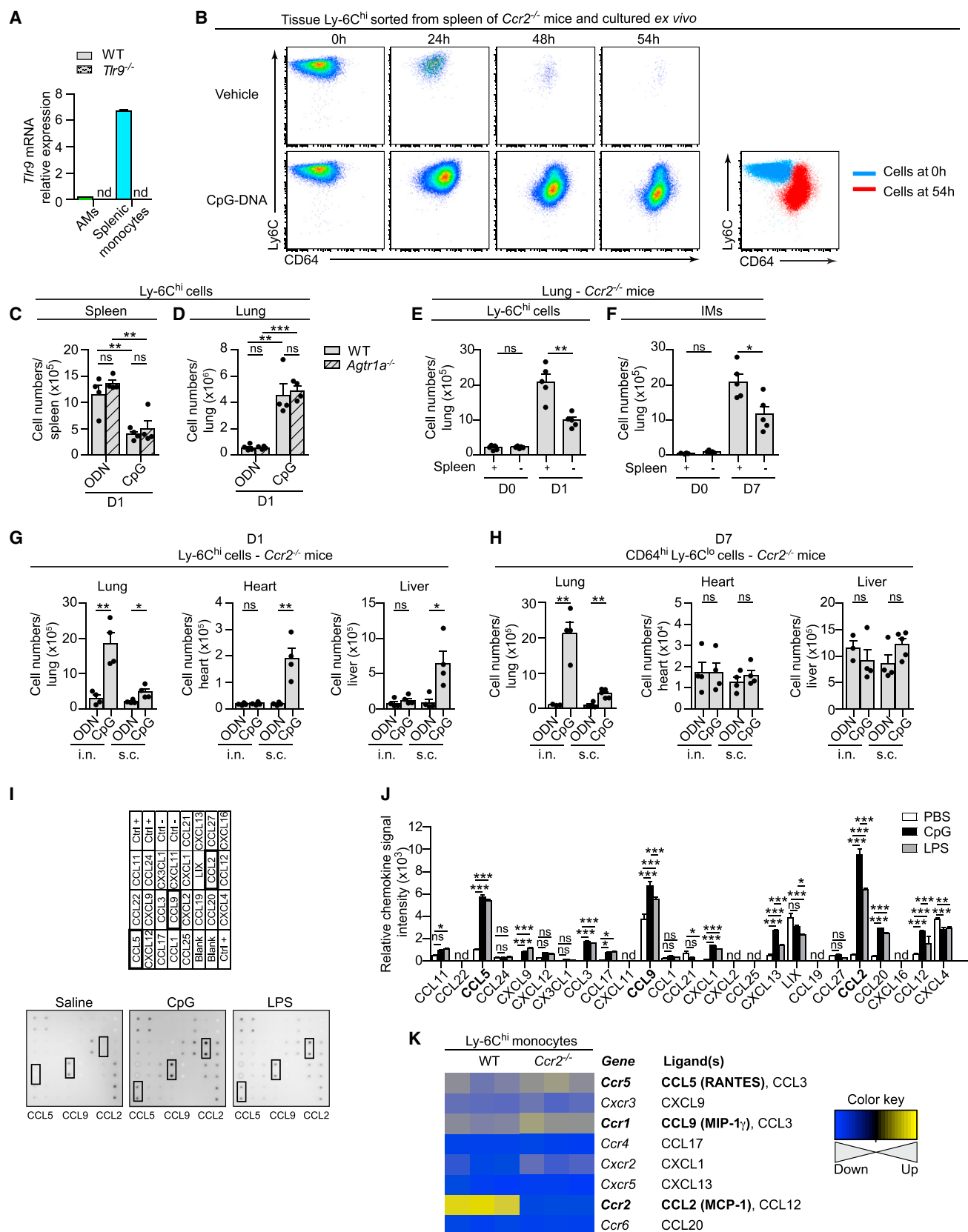
HDM-Induced Model of Asthma and CpG Treatments

Lightly isoflurane-anesthetized WT, *Tlr9*^{-/-}, or ITIB mice were sensitized by two weekly i.n. instillations of vehicle (LPS-free saline) or HDM extracts (100 μ g in 50 μ L) on days 0 and 7. In experiments shown in [Figure 3](#), mice received i.n. installation of 50 μ L saline containing 50 μ g ODN or 50 μ g CpG 7 days before the first HDM treatment (day -7) and were sacrificed at day 10. In experiments shown in [Figure 4](#), mice received i.n. installation of 50 μ L saline containing 50 μ g ODN or 50 μ g CpG 7 days after the second HDM treatment (day 14). Mice were then challenged by an i.n. instillation of vehicle or HDM (100 μ g in 50 μ L) and were sacrificed at day 24. For adoptive-transfer experiments, WT mice were transferred intratracheally with 1.5×10^6 AMs or CpG IMs sorted from CpG-treated WT or *Il10*^{-/-} mice or with vehicle (50 μ L saline) 24 hr before HDM administrations.

Figure 6. CpG-Induced Differentiation of IMs from TLR9-Responsive CCR2-Independent Lung Monocytes

- (A) Dot plots of lung-associated classical monocytes (Ly-6C^{hi}), patrolling monocytes (Ly-6C^{lo}CD64^{lo}), and IMs (Ly-6C^{lo}CD64^{hi}) in the indicated groups (same strategy as in [Figure 1A](#)). The gate in blue represents lung monocytes. Numbers indicate the percentages of gated cells in the subpopulation.
- (B) Analysis of 6-month-old WT *Ccr2*^{-/-} parabionts 24 hr after i.v. Clo-Lip treatment. The percentage of enrichment in partner cells within each host is shown. Bar graphs (mean + SEM) show summary data pooled from two pairs of parabionts.
- (C–E) Mixed BM competitive chimeras were analyzed at day 56 or 84, 24 hr after i.v. injection of Clo-Lip. (C) Dot plots showing the percentage of WT and *Ccr2*^{-/-} BM-derived cells and host radio-resistant cells within the indicated populations. (D) Percentage of BM chimerism and radio-resistance of the indicated populations. (E) Pie charts depicting the average absolute cell number and the CCR2 independence (dotted area) in the indicated cell populations.
- (F) Waterfall (i.e., differentiation pattern from Ly-6C^{hi}CD64^{lo} to Ly-6C^{lo}CD64^{hi} cells) after i.n. CpG treatment in vivo.
- (G) *Tlr9* mRNA expression in AMs, IMs, and lung monocytes sorted from WT or *Tlr9*^{-/-} mice.
- (H) Western blot of Erk and phospho-Erk (Erk-p) in lung monocytes sorted from *Ccr2*^{-/-} mice and stimulated ex vivo with saline (CT), ODN, or CpG.
- (I) Waterfall of lung monocytes sorted from *Ccr2*^{-/-} mice and stimulated ex vivo with vehicle or CpG.
- (J) Superposition of dot plots of living lung monocytes before and 54 hr after stimulation with CpG.
- (K) Absolute numbers of lung monocytes in WT and *Ccr2*^{-/-} mice before and 1, 3, and 7 days after i.n. CpG instillation.
- (L) Incorporation of i.p. EdU injection 24 hr before was assessed at day 0 and 1 day after i.n. CpG instillation in *Ccr2*^{-/-} mice. WT BM cells were used as controls. Numbers indicate the percentage of EdU⁺ cells.

Data in (A), (F), (H), (I), and (L) represent one of at least six samples from three independent experiments. Data in (D), (G), and (K) show the mean + SEM and are pooled from three independent experiments (n = 6–15 per group) (D and K) or two independent sorting experiments (n = 4 samples per group) (G). p values were calculated with a one-way (D) or two-way (K) ANOVA followed by Tukey's post hoc tests (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; ns, not significant). D, day. See also [Figure S6](#) for numbers of lung monocytes before irradiation and after BM reconstitution, as well as after LPS treatment, and ex vivo differentiation of LPS- or CpG-stimulated lung monocytes from WT or *Tlr9*^{-/-} mice, respectively.



(legend on next page)

We estimated AHR by assessing dynamic airway resistance in anesthetized animals with a FlexiVent small animal ventilator (SCIREQ). Mice were sacrificed, and BALF, lung, and LN cells were harvested and analyzed as described previously (Marichal et al., 2010).

Additional details can be found in the [Supplemental Information](#).

Additional Methods

Methodological details regarding cytologic examination, immunohistochemistry, microarrays, GSEAs, IL-10 detection, generation of mixed BM chimeras and parabiotic mice, EdU incorporation, ex vivo stimulation of tissue monocytes with CpG and LPS, western blot, real-time PCR, splenectomy, chemokine detection, and inhibition are described in the [Supplemental Information](#).

Statistical Analyses

Statistical analyses were performed with R (version 3.2.4). Data from independent experiments were pooled for analysis in each data panel unless otherwise indicated. Raw data were transformed when needed and were back-transformed for graphical presentation. Assumptions of the normal distribution of residuals and homoscedasticity were verified with diagnostic plots. We considered a p value lower than 0.05 to be significant (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; ns, not significant).

ACCESSION NUMBERS

The accession number for the microarray data reported in this paper is Array Express: E-MTAB-5012.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information include Supplemental Experimental Procedures and seven figures and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2017.02.016>.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

F.B. conceived the project; C.S., C.R., L.F., C.J.D., T.M., and F.B. designed the experiments with help from F.G.; T.M. and F.B. supervised the project; C.S., C.R., and L.F. did most of the experiments and compiled the data; C.F., S.O., and M.T. participated in several experiments; S.C. performed the experiments with parabiotic mice; J.-C.S. provided the *S. pneumonia* clinical isolate; G.P. performed the immunohistochemistry and helped with histological examinations; X.X., D.P., and L.G. performed the microarray analyses; T.M. and L.F. performed splenectomies; H.B. provided the ITIB mice and helped with experiments involving such mice; D.C. and P.Q. made their equipment and facilities available for AHR measurement and microbial infection, respectively; C.S. and L.F. prepared the figures; T.M. and F.B. wrote the manuscript; and all authors provided feedback on the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. François Trottein (Institut Pasteur de Lille) for providing *Influenza A virus*; Prof. Hans Nauwynck (Ghent University) for advice; Dr. Natalia Kosovska from the Stanford PAN facility; Dr. Sandra Ormenese and Raafat Stephan from the Cell Imaging and Flow Cytometry GIGA Platform; Dr. Pierre Drion and other staff members from the Mouse Facility and Transgenics GIGA Platform; Dr. Chantal Humblet from the GIGA Immunohistology Platform; and Raja Fares, Cédric François, and Ilham Sbati for excellent technical and secretarial assistance. The Laboratory of Cellular and Molecular Immunology is supported by the F.R.S.-FNRS for the FRFS-WELBIO under grant CR-2012S-01R, by the Belgian Program on Interuniversity Attraction Poles (IUAP; T-TIME; P7/39), and by an "Action de Recherche Concertée de la Fédération Wallonie-Bruxelles de Belgique" (12/07-03-ITPKC). C.S. and C.R. are research fellows of the F.R.S.-FNRS, L.F. is supported by the FRFS-WELBIO (CR-2012S-01R), T.M. is supported by the Acteria Foundation, and C.D. and T.M. are research associates of the F.R.S.-FNRS.

Received: August 9, 2016

Revised: December 21, 2016

Accepted: January 24, 2017

Published: March 21, 2017

REFERENCES

- Aziz, A., Soucie, E., Sarrazin, S., and Sieweke, M.H. (2009). MafB/c-Maf deficiency enables self-renewal of differentiated functional macrophages. *Science* 326, 867–871.
- Bain, C.C., Bravo-Blas, A., Scott, C.L., Gomez Perdiguero, E., Geissmann, F., Henri, S., Malissen, B., Osborne, L.C., Artis, D., and Mowat, A.M. (2014). Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice. *Nat. Immunol.* 15, 929–937.
- Bedoret, D., Wallemacq, H., Marichal, T., Desmet, C., Quesada Calvo, F., Henry, E., Closset, R., Dewals, B., Thielen, C., Gustin, P., et al. (2009). Lung interstitial macrophages alter dendritic cell functions to prevent airway allergy in mice. *J. Clin. Invest.* 119, 3723–3738.
- Beeh, K.M., Kanniss, F., Wagner, F., Schilder, C., Naudts, I., Hammann-Haenni, A., Willers, J., Stocker, H., Mueller, P., Bachmann, M.F., and Renner, W.A. (2013). The novel TLR-9 agonist QbG10 shows clinical efficacy in persistent allergic asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 131, 866–874.
- Bouabe, H., Liu, Y., Moser, M., Bösl, M.R., and Heesemann, J. (2011). Novel highly sensitive IL-10-beta-lactamase reporter mouse reveals cells of the innate immune system as a substantial source of IL-10 in vivo. *J. Immunol.* 187, 3165–3176.
- Braun-Fahrlander, C., Riedler, J., Herz, U., Eder, W., Waser, M., Grize, L., Maisch, S., Carr, D., Gerlach, F., Bufe, A., et al.; Allergy and Endotoxin

Figure 7. Mobilization of CCR2-Independent Spleen Reservoir Monocytes to the Lung and Differentiation into CpG IMs

- (A) *Tlr9* mRNA expression in splenic monocytes and AMs sorted from WT or *Tlr9*^{−/−} mice.
- (B) Waterfall of splenic monocytes sorted from *Ccr2*^{−/−} mice and stimulated ex vivo with vehicle or CpG. The right panel shows the superposition of dot plots of living lung monocytes before and 54 hr after stimulation with CpG. Data represent one of at least four samples from two independent experiments.
- (C and D) Absolute numbers of Ly-6C^{hi} monocytes in the spleen (C) and lung (D) of WT and *Agtr1a*^{−/−} mice 1 day after i.n. CpG treatment. Data show the mean + SEM and represent one of two independent experiments (n = 4 per group).
- (E and F) Absolute numbers of Ly-6C^{hi} monocytes (E) or IMs (F) in splenectomized and sham-operated mice before (day 0) and 1 day (E) or 7 days (F) after i.n. CpG treatment.
- (G and H) Absolute numbers of Ly-6C^{hi} monocytes (G) and Ly-6C^{lo}CD64^{hi} macrophages (H) 1 day (G) and 7 days (H) after i.n. or subcutaneous ODN or CpG treatment of *Ccr2*^{−/−} mice.
- (I and J) Chemokine array was performed on whole lung proteins extracted 8 hr after i.n. PBS, LPS, or CpG treatment of WT mice. (I) Representative blots depicting the detected signals; the boxes show the most induced chemokines. (J) Quantification of chemokine signal intensity.
- (K) Heatmap showing gene expression of the receptors for chemokines that were significantly induced by CpG in (J).
- Data in (A), (E)–(H), and (J) show the mean + SEM and are pooled from two (A, F–H, and J) or three (E) independent experiments (n = 3–6 per group). p values were calculated with a two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc tests (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; ns, not significant). Ctrl, control; D, day. See also [Figure S7](#) for the numbers of spleen monocytes in *Ccr2*^{−/−} mice and in vivo chemokine neutralization experiments.

- Study Team (2002). Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N. Engl. J. Med.* **347**, 869–877.
- Broide, D., Schwarze, J., Tighe, H., Gifford, T., Nguyen, M.D., Malek, S., Van Uden, J., Martin-Orozco, E., Gelfand, E.W., and Raz, E. (1998). Immunostimulatory DNA sequences inhibit IL-5, eosinophilic inflammation, and airway hyperresponsiveness in mice. *J. Immunol.* **161**, 7054–7062.
- Chen, L., Arora, M., Yarlagadda, M., Oriss, T.B., Krishnamoorthy, N., Ray, A., and Ray, P. (2006). Distinct responses of lung and spleen dendritic cells to the TLR9 agonist CpG oligodeoxynucleotide. *J. Immunol.* **177**, 2373–2383.
- Covarrubias, A.J., Aksoylar, H.I., Yu, J., Snyder, N.W., Worth, A.J., Iyer, S.S., Wang, J., Ben-Sahra, I., Byles, V., Polynne-Stapomkul, T., et al. (2016). Akt-mTORC1 signaling regulates Acly to integrate metabolic input to control of macrophage activation. *eLife* **5**, e11612.
- Creticos, P.S., Schroeder, J.T., Hamilton, R.G., Balcer-Whaley, S.L., Khattignavong, A.P., Lindblad, R., Li, H., Coffman, R., Seyfert, V., Eiden, J.J., and Broide, D.; Immune Tolerance Network Group (2006). Immunotherapy with a ragweed-toll-like receptor 9 agonist vaccine for allergic rhinitis. *N. Engl. J. Med.* **355**, 1445–1455.
- Davies, L.C., Rosas, M., Jenkins, S.J., Liao, C.T., Scurr, M.J., Brombacher, F., Fraser, D.J., Allen, J.E., Jones, S.A., and Taylor, P.R. (2013). Distinct bone marrow-derived and tissue-resident macrophage lineages proliferate at key stages during inflammation. *Nat. Commun.* **4**, 1886.
- de Heer, H.J., Hammad, H., Soullié, T., Hijdra, D., Vos, N., Willart, M.A., Hoogsteden, H.C., and Lambrecht, B.N. (2004). Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen. *J. Exp. Med.* **200**, 89–98.
- Eder, W., Ege, M.J., and von Mutius, E. (2006). The asthma epidemic. *N. Engl. J. Med.* **355**, 2226–2235.
- Eisenbarth, S.C., Piggott, D.A., Huleatt, J.W., Visintin, I., Herrick, C.A., and Bottomly, K. (2002). Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *J. Exp. Med.* **196**, 1645–1651.
- Epelman, S., Lavine, K.J., Beaudin, A.E., Sojka, D.K., Carrero, J.A., Calderon, B., Brija, T., Gautier, E.L., Ivanov, S., Satpathy, A.T., et al. (2014). Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation. *Immunity* **40**, 91–104.
- Gautier, E.L., Shay, T., Miller, J., Greter, M., Jakubzick, C., Ivanov, S., Helft, J., Chow, A., Elpek, K.G., Gordonov, S., et al.; Immunological Genome Consortium (2012). Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nat. Immunol.* **13**, 1118–1128.
- Geissmann, F., Jung, S., and Littman, D.R. (2003). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* **19**, 71–82.
- Ginhoux, F., and Guillemins, M. (2016). Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity* **44**, 439–449.
- Gomez Perdiguero, E., Klapproth, K., Schulz, C., Busch, K., Azzoni, E., Crozet, L., Garner, H., Trouillet, C., de Bruijn, M.F., Geissmann, F., and Rodewald, H.R. (2015). Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythromyeloid progenitors. *Nature* **518**, 547–551.
- Häcker, H., Mischak, H., Häcker, G., Eser, S., Prenzel, N., Ullrich, A., and Wagner, H. (1999). Cell type-specific activation of mitogen-activated protein kinases by CpG-DNA controls interleukin-12 release from antigen-presenting cells. *EMBO J.* **18**, 6973–6982.
- Hammad, H., Chieppa, M., Perros, F., Willart, M.A., Germain, R.N., and Lambrecht, B.N. (2009). House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells. *Nat. Med.* **15**, 410–416.
- Hanna, R.N., Carlin, L.M., Hubbeling, H.G., Nackiewicz, D., Green, A.M., Punt, J.A., Geissmann, F., and Hedrick, C.C. (2011). The transcription factor NR4A1 (Nur77) controls bone marrow differentiation and the survival of Ly6C⁺ monocytes. *Nat. Immunol.* **12**, 778–785.
- Hashimoto, D., Chow, A., Noizat, C., Teo, P., Beasley, M.B., Leboeuf, M., Becker, C.D., See, P., Price, J., Lucas, D., et al. (2013). Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity* **38**, 792–804.
- Hopstädter, J., Diesel, B., Zarbock, R., Breinig, T., Monz, D., Koch, M., Meyerhans, A., Gortner, L., Lehr, C.M., Huwer, H., and Kiemer, A.K. (2010). Differential cell reaction upon Toll-like receptor 4 and 9 activation in human alveolar and lung interstitial macrophages. *Respir. Res.* **11**, 124.
- Kline, J.N., Waldschmidt, T.J., Businga, T.R., Lemish, J.E., Weinstock, J.V., Thorne, P.S., and Krieg, A.M. (1998). Modulation of airway inflammation by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma. *J. Immunol.* **160**, 2555–2559.
- Kline, J.N., Kitagaki, K., Businga, T.R., and Jain, V.V. (2002). Treatment of established asthma in a murine model using CpG oligodeoxynucleotides. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **283**, L170–L179.
- Krieg, A.M. (2006). Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 471–484.
- Krieg, A.M. (2012). CpG still rocks! Update on an accidental drug. *Nucleic Acid Ther.* **22**, 77–89.
- Lambrecht, B.N., De Veerman, M., Coyle, A.J., Gutierrez-Ramos, J.C., Thielemans, K., and Pauwels, R.A. (2000). Myeloid dendritic cells induce Th2 responses to inhaled antigen, leading to eosinophilic airway inflammation. *J. Clin. Invest.* **106**, 551–559.
- Lazarus, R., Klimecki, W.T., Raby, B.A., Vercelli, D., Palmer, L.J., Kwiatkowski, D.J., Silverman, E.K., Martinez, F., and Weiss, S.T. (2003). Single-nucleotide polymorphisms in the Toll-like receptor 9 gene (TLR9): frequencies, pairwise linkage disequilibrium, and haplotypes in three U.S. ethnic groups and exploratory case-control disease association studies. *Genomics* **81**, 85–91.
- Marichal, T., Bedoret, D., Mesnil, C., Pichavant, M., Goriely, S., Trottein, F., Cataldo, D., Goldman, M., Lekeux, P., Bureau, F., and Desmet, C.J. (2010). Interferon response factor 3 is essential for house dust mite-induced airway allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **126**, 836–844.e13.
- Mesnil, C., Raulier, S., Paulissen, G., Xiao, X., Birrell, M.A., Pirotin, D., Janss, T., Starkl, P., Ramery, E., Henket, M., et al. (2016). Lung-resident eosinophils represent a distinct regulatory eosinophil subset. *J. Clin. Invest.* **126**, 3279–3295.
- Monsalve, E., Ruiz-García, A., Baladrón, V., Ruiz-Hidalgo, M.J., Sánchez-Solana, B., Rivero, S., García-Ramírez, J.J., Rubio, A., Laborda, J., and Díaz-Guerra, M.J. (2009). Notch1 upregulates LPS-induced macrophage activation by increasing NF-kappaB activity. *Eur. J. Immunol.* **39**, 2556–2570.
- Mosser, D.M., and Edwards, J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 958–969.
- Ostuni, R., Piccolo, V., Barozzi, I., Polletti, S., Termanini, A., Bonifacio, S., Curina, A., Prosperini, E., Ghisletti, S., and Natoli, G. (2013). Latent enhancers activated by stimulation in differentiated cells. *Cell* **152**, 157–171.
- Roy, S.R., Schiltz, A.M., Marotta, A., Shen, Y., and Liu, A.H. (2003). Bacterial DNA in house and farm barn dust. *J. Allergy Clin. Immunol.* **112**, 571–578.
- Schuijs, M.J., Willart, M.A., Vergote, K., Gras, D., Deswarte, K., Ege, M.J., Madeira, F.B., Beyaert, R., van Loo, G., Bracher, F., et al. (2015). Farm dust and endotoxin protect against allergy through A20 induction in lung epithelial cells. *Science* **349**, 1106–1110.
- Serbina, N.V., and Pamer, E.G. (2006). Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat. Immunol.* **7**, 311–317.
- Smit, L.A., Siroux, V., Bouzigon, E., Oryszczyn, M.P., Lathrop, M., Demenais, F., and Kauffmann, F.; Epidemiological Study on the Genetics and Environment of Asthma, Bronchial Hyperresponsiveness, and Atopy (EGEA) Cooperative Group (2009). CD14 and toll-like receptor gene polymorphisms, country living, and asthma in adults. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **179**, 363–368.
- Strachan, D.P. (1989). Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* **299**, 1259–1260.
- Sur, S., Wild, J.S., Choudhury, B.K., Sur, N., Alam, R., and Klinman, D.M. (1999). Long term prevention of allergic lung inflammation in a mouse model of asthma by CpG oligodeoxynucleotides. *J. Immunol.* **162**, 6284–6293.

- Swirski, F.K., Nahrendorf, M., Etzrodt, M., Wildgruber, M., Cortez-Retamozo, V., Panizzi, P., Figueiredo, J.L., Kohler, R.H., Chudnovskiy, A., Waterman, P., et al. (2009). Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* 325, 612–616.
- Tamoutounour, S., Williams, M., Montanana Sanchis, F., Liu, H., Terhorst, D., Malosse, C., Pollet, E., Ardouin, L., Luche, H., Sanchez, C., et al. (2013). Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin. *Immunity* 39, 925–938.
- Tan, S.Y., and Krasnow, M.A. (2016). Developmental origin of lung macrophage diversity. *Development* 143, 1318–1327.
- Thorne, P.S., Kulhánková, K., Yin, M., Cohn, R., Arbes, S.J., Jr., and Zeldin, D.C. (2005). Endotoxin exposure is a risk factor for asthma: the national survey of endotoxin in United States housing. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 172, 1371–1377.
- van Furth, R., and Cohn, Z.A. (1968). The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J. Exp. Med.* 128, 415–435.
- van Rijt, L.S., Jung, S., Kleinjan, A., Vos, N., Willart, M., Duez, C., Hoogsteden, H.C., and Lambrecht, B.N. (2005). In vivo depletion of lung CD11c+ dendritic cells during allergen challenge abrogates the characteristic features of asthma. *J. Exp. Med.* 201, 981–991.
- von Mutius, E. (2016). The microbial environment and its influence on asthma prevention in early life. *J. Allergy Clin. Immunol.* 137, 680–689.



Role of neutrophils in allergic asthma

Coraline Radermecker^{1,2}, Renaud Louis^{3,4}, Fabrice Bureau^{1,2,5} and Thomas Marichal^{1,2,5}

The contribution of neutrophils to asthma pathogenesis has been mainly studied in the context of non-allergic neutrophilic asthma. However, neutrophils can also be rapidly recruited and are largely present in the airways of allergic eosinophilic asthmatic patients. Under these circumstances, they possess specific phenotypic features distinguishing them from resting blood neutrophils and are endowed with particular functions. The exact contribution of neutrophils to allergic asthma pathogenesis is still unclear, but growing experimental evidence supports the ability of neutrophils or neutrophil-derived products to influence the underlying allergic type 2 immune response and cardinal features of allergic asthma, thus shedding new light on neutrophil biology and functions in an allergic context.

Addresses

¹ Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, GIGA Institute, Liege University, Avenue de l'Hôpital 11, 4000 Liege, Belgium

² Faculty of Veterinary Medicine, Liege University, B42, Avenue de Cureghem 5D, 4000 Liege, Belgium

³ Department of Pulmonary Medicine, Centre Hospitalier Universitaire (CHU), Liege University, Avenue de l'Hôpital 11, 4000 Liege, Belgium

⁴ Laboratory of Pneumology, GIGA Institute, Liege University, Avenue de l'Hôpital 11, 4000 Liege, Belgium

⁵ WELBIO, Walloon Excellence in Life Sciences and Biotechnology, Wallonia, Belgium

Corresponding authors: Bureau, Fabrice (fabrice.bureau@uliege.be), Marichal, Thomas (t.marichal@uliege.be)

Current Opinion in Immunology 2018, **54**:28–34

This review comes from a themed issue on **Allergy and hypersensitivity**

Edited by **Onur Boyman, Alexander Eggel and Mario Noti**

For a complete overview see the [Issue](#) and the [Editorial](#)

Available online 6th June 2018

<https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.05.006>

0952-7915/© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Neutrophils represent the most abundant immune cell type in the blood and are generated in the bone marrow under the control of key transcription factors such as C/EBP α , PU.1, Gfi-1 and C/EBP ϵ [1]. They have long been known as short-lived (half-life: 6–12 hours [2]) innate immune cells specialized in pathogen killing through their high phagocytic potential and the secretion of

cytotoxic granules once recruited in the tissues [1]. Today, a more complex picture of the neutrophil is emerging, with immunoregulatory properties and implications in various non-infectious disorders [3]. Of note, unlike previously appreciated, neutrophils are now thought to encompass distinct phenotypic and functional subsets in humans [4,5] and mice [6,7], some of them exhibiting an extended half-life in certain inflammatory conditions [3]. Furthermore, in 2004, Brinkmann and colleagues have discovered the ability of neutrophils to form neutrophil extracellular traps (NETs), whose roles in health and disease are currently under close scrutiny (Box 1), and which has arguably contributed to the renewed interest in neutrophils [8].

Asthma constitutes a heterogeneous group of respiratory inflammatory disorders characterized by a similar clinical pattern of cough, wheeze and reversible airway obstruction [9]. Asthma phenotypes can be categorized according to clinical symptoms, specific triggers, inflammatory or immune status, or treatment response [10,11]. If one refers to an inflammatory phenotype classification [12,13], allergic asthma belongs to the 'eosinophilic' phenotype (Table 1). Notably, while patients with more than 3% sputum eosinophils are considered 'eosinophilic', up to 60% sputum neutrophils can also be present [10,12,13]. Immunologically, allergic asthma is characterized by the development of an aberrant immune response with a predominant adaptive type 2 T helper cell (Th2) profile directed against inhaled allergens [9]. Such Th2 response, via the secretion of cytokines such as interleukin(IL)-4, IL-5, IL-13, orchestrates many cardinal features of allergic asthma, such as eosinophilic inflammation, mucus hypersecretion, airway hyperresponsiveness and increased serum levels of type E immunoglobulins (IgE) [14].

Neutrophil recruitment in allergic asthmatic lungs

While neutrophils are not steadily present in the airways of allergic asthmatic patients, they are one of the first innate immune cells recruited into the lungs during specific asthma-related events such as allergenic challenges [15–17], virus-induced asthma exacerbations [18^{••}, 19,20] or nocturnal crises [21]. In mice, airway exposure to clinically relevant allergens that promote features of allergic asthma is also associated with the airway recruitment of neutrophils [18^{••}, 22^{••}, 23[•], 24].

Like in other tissues, the recruitment of neutrophils into the respiratory tract comprises several steps that are

Box 1 Neutrophil extracellular traps.

Neutrophil extracellular traps (NETs) are web-like structures composed of nuclear or mitochondrial chromatin associated to modified (e.g. citrullinated) histone proteins and decorated with 20–50 different proteins, such as neutrophil elastase, myeloperoxidase (MPO), LL37, cathepsin G, proteinase 3 or high mobility group protein B1. NETs can be released in the extracellular space in response to various microbial (e.g. bacteria, viruses, parasites, lipopolysaccharide [LPS]) and non-microbial (e.g. phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), crystals) stimuli. The molecular mechanisms of NET formation are not yet fully understood and may differ according to the stimuli (reviewed in [48]). Reactive oxygen species (ROS) formation, activation of the MEK/ERK pathway downstream of membrane receptors (PSGL1, RAGE, TLR2/4, Dectin 2, FcγR, Siglec 14), activation of autophagy (through the inhibition of mTOR pathway or the activation of the PI3K pathway) and induction of necroptosis have all been implicated in NET formation. If NETs were originally discovered for their role in bacterial killing [8], they have been more recently associated with non-infectious disorders like thrombosis, vasculitis, systemic lupus erythematosus, diabetes, cancer, asthma or chronic obstructive pulmonary disease (COPD) [60].

initiated by the endothelial expression of adhesion molecules [25] and followed by extravasation and migration according to a chemokine gradient. In a mouse model of ragweed pollen extract challenge, Hosoki and colleagues demonstrated that lung neutrophil recruitment was substantially lower in mice lacking the LPS receptor Toll like receptor (TLR)-4 [22^{••}]. Similarly, inhibition of CXCR2, the receptor for CXCL1, CXCL2 and CXCL5 in mice, inhibited allergen-induced innate recruitment of neutrophils [22^{••}], and the production of CXCL1, CXCL2 and CXCL5 was shown to be dependent on TLR-4 and its co-receptor MD2 in response to cat dander and other relevant pollens [22^{••}, 23[•]]. Epithelial cells might be the source of such chemokines, as they have been shown, in humans, to secrete CXCL8 (i.e. IL-8, the human analogue of CXCL1, CXCL2 and CXCL5) following

allergenic challenges [23[•], 26]. In addition, alveolar macrophages may also deliver CXCL1 and CXCL2 in response to allergen-induced and antibody-mediated activation of FCγIII receptors [27]. In humans, sputum levels of CXCL8 have been shown to be increased during acute allergic asthma exacerbations [19] and following allergenic challenge [15], which was associated with increased sputum neutrophils and blood neutrophil chemotaxis [15].

Oyoshi and colleagues demonstrated, in a model of skin allergy, that neutrophil-intrinsic leukotriene B4 (LTB4) synthesis and its receptor, BLT1, were involved in neutrophil recruitment [28]. Interestingly, LTB4 levels were increased in the BALF of asthmatic patients suffering from nocturnal asthma [29] and in exhaled breath condensate of asthmatic children [30] and adults [31]. In addition, the use of a LTB4 inhibitor in asthmatic patients triggered a substantial decrease in BALF neutrophils [32].

The Th2-associated cytokine IL-4 may control neutrophil recruitment during allergic asthma. Indeed, a recent study has demonstrated that IL-4 could dampen neutrophil expansion and migration through neutrophil-intrinsic IL-4 receptor signaling in mice [33^{••}]. *Ex vivo* treatment of bone marrow neutrophils with IL-4 inhibited neutrophil migration in response to CXCL1 and CXCL2 by IL-4 receptor-dependent mechanisms [33^{••}]. In a model of airpouch, CXCR2-dependent neutrophil recruitment was also inhibited when IL-4 biological half-life was prolonged [30]. The potential contribution of the IL-4/IL-4 receptor axis to the regulation of neutrophil numbers in the airways of allergic asthmatic patients or experimental animals will however require further investigations. Mast cells, whose allergen-dependent and IgE-dependent degranulation is thought to contribute to the acute

Table 1**Asthma inflammatory phenotypes**

Phenotype	Inflammatory cells present in the airways	Immunological and inflammatory biomarkers	Severity	Triggers	Immune profile
Eosinophilic	Sputum eosinophils (>3%) Sputum neutrophils (<76%)	Specific IgE Th2-associated cytokines (IL-4, IL-5, IL-13) [61, 62]	Mild to severe	Allergens (75%) Exercise Occupational (15%) Aspirin	Th2>>>Th17
Neutrophilic	Sputum Neutrophils (>76%)	IL-8 Neutrophil elastase IL-1β TNF-α micro RNA-629-3p, 223-3p and 142-3p [62]	Severe	Obesity Tobacco smoke Exposition to irritants	Th17>>>Th2
Paucigranulocytic	Levels of sputum eosinophils <3% and neutrophils <76%	?	Moderate	Not defined	?
Mixed granulocytic	High levels of sputum eosinophils (>3%) and neutrophils (>76%)	?	Severe	Not defined	Th2/Th17?

Source: Adapted from [9, 12, 13].

allergic reaction [34], may also negatively regulate neutrophil influx in allergic asthmatic airways. Indeed, levels of mast cell-specific tryptase were found elevated in BALF of eosinophilic asthmatic patients [35], and such tryptase has been shown to be a strong chemorepellent for neutrophils *in vitro* [36].

Phenotypic and functional features of neutrophils in allergic asthma

Several pieces of evidence support that neutrophils undergo profound changes in the blood and lungs of allergic asthmatic individuals. A recent clinical study compared the innate immune responses of two populations of children (i.e. Amish and Hutterite) sharing same ancestry, lifestyles but exposed to different levels of endotoxins [37^{**}]. Briefly, Hutterite children, who are raised in an environment poor in endotoxins, are susceptible to allergic asthma, whereas Amish children live in endotoxin-rich homes and are protected against allergic asthma development [37^{**}]. Notably, blood neutrophils from asthma-prone Hutterite children expressed higher levels of CXCR4 and CD11b, as well as lower levels of CD11c, as compared to the ones isolated from Amish children [37^{**}]. Blood and nasal lavage neutrophils of atopic asthmatic patients have also been shown to express higher surface levels of CD49d than neutrophils of healthy subjects [5]. CD49d expression is further increased six hours after allergen challenge [5], suggesting a possible interaction between neutrophils and the specific allergens. Such interaction could be achieved by allergen-induced crosslinking of the high affinity IgE receptor (FcεRI), whose expression is higher in blood neutrophils from asthmatic patients [38] and increased during the pollen season [39]. Interestingly, the interaction between specific allergens and IgE/FcεRI on the neutrophil surface has been shown to enhance functional responses by increasing secretion of neutrophil products in asthmatic patients, like matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) [40], neutrophil elastase (NE) [41], myeloperoxidase [42], IL-8 [43], eosinophil cationic protein [44] and reactive oxygen species (ROS) [45]. Moreover, as compared to neutrophils from healthy individuals, neutrophils from asthmatic patients exhibited boosted functional responses *in vitro*, such as an enhanced migratory capacity, a higher digestion phase in phagocytosis assays [46] and increased secretion of tumor necrosis factor (TNF)α, GM-CSF or interferon γ [47].

Recently, Toussaint and colleagues have shown, in a human experimental model of rhinovirus-induced allergic asthma exacerbations, that rhinoviruses promoted the release of host double-stranded DNA (dsDNA) and NE, two major NET components [48], supporting that NET-prone neutrophils were specifically recruited during asthma exacerbations.

Contribution of neutrophils to allergic asthma pathogenesis

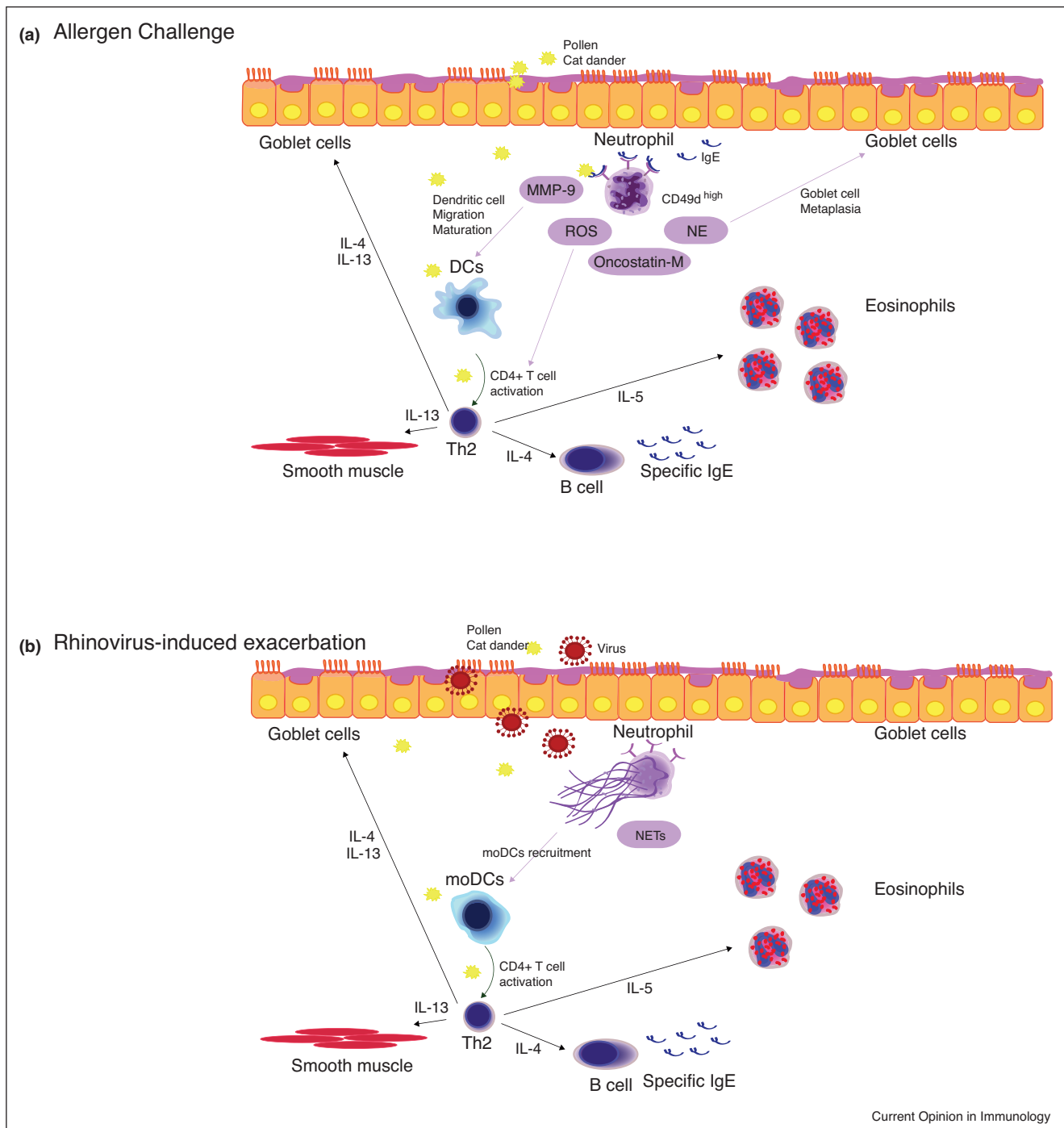
Given their large presence, their specific phenotype and their ability to secrete a wide range of products during allergic asthma, neutrophils are appealing candidates that may contribute to disease pathogenesis (Figure 1).

Using a model of airway allergy, Hosoki and colleagues showed that impaired neutrophil recruitment in TLR-4-deficient mice or in wild-type mice treated with a CXCR2 inhibitor was associated with decreased eosinophilic inflammation, IgE, Th2 cytokines and mucus secretion [22^{**}]. Transfer of wild-type neutrophils in the trachea of TLR-4-deficient mice was sufficient to restore the Th2 immune response and features of airway allergy in this model, supporting that neutrophils could facilitate allergic sensitization and inflammation [22^{**}]. Surprisingly, in a clinical study including Japanese children with primary autoimmune neutropenia, the incidence of asthma in 'neutrophil-deficient' children was found to be substantially lower as compared to a group of control children, and returned to the control levels with the resolution of neutropenia [49], supporting that neutrophils may promote asthma onset in humans, too.

Among the large range of neutrophil products, some of them have been identified to be present at higher levels in allergic asthmatic airways and to contribute in disease pathogenesis (Figure 1). Upon *ex vivo* stimulation with a relevant allergen, MMP-9 release and respiratory burst (i.e. associated with the production of ROS) were found to be higher in neutrophils of allergic asthmatic patients as compared to control neutrophils [40,45]. To address the role of MMP-9 and ROS *in vivo*, transgenic mice in which MMP-9 expression is lacking or ROS production is impaired have been subjected to a model of allergic asthma based on administration of ovalbumin (OVA) and the Th2 adjuvant alum [50–52]. Upon allergenic challenge, mice deficient in MMP-9 had an impaired recruitment of inflammatory cells, which was accompanied by a lower bronchial hyperreactivity, less IL-13 and fewer OVA-specific IgE [50,52]. Furthermore, Vermaelen and colleagues observed that the migration and maturation of dendritic cells, the main antigen-presenting cells responsible for Th2 sensitization, were compromised in the lungs of MMP-9-deficient mice, which could explain the altered development of the Th2 immune-mediated airway allergy [52]. Similarly, ROS-impaired mice failed to develop eosinophilic inflammation, mucus secretion and IL-13 secretion [51], and the ability of splenocytes to secrete IL-13 upon stimulation was also impaired in those animals, supporting that the Th2 response was facilitated by ROS [51].

Neutrophils were found to be a major source of oncostatin M, an important player in mucosal barrier dysfunction [53], in allergic asthmatic patients [54]. The exact

Figure 1



Putative contributions of neutrophils to allergic asthma. **(a)** Upon allergenic challenges, neutrophils are one of the first innate immune cells recruited to the airways. They are able to secrete matrix metalloproteinase 9 (MMP-9), reactive oxygen species (ROS), oncostatin-M, and neutrophil elastase (NE), among others via IgE-dependent mechanisms. MMP-9 induces the recruitment and maturation of lung dendritic cells, which mediate Th2 sensitization. ROS can interact with the activation of Th2 cells. Oncostatin-M has a global facilitating effect on asthma hallmarks. NE can stimulate mucus cell metaplasia. **(b)** During allergic asthma exacerbations provoked by respiratory viral infections, neutrophils can release NETs, which attract monocyte-derived dendritic cells (moDCs) into the lung and promote type 2-mediated exacerbations.

contribution of oncostatin M to allergic asthma is still unclear, but endotracheal treatment of mice with adenovirus expressing mouse oncostatin-M has been shown to be sufficient to promote features of allergic asthma [55].

During the challenge phase of a OVA/alum model, NE inhibition was associated with decreased mucus cell numbers, eosinophil recruitment, bronchial hyperreactivity and Th2 immune responses [56]. In addition, mice chronically exposed to NE developed mucus cell metaplasia and lung eosinophilic inflammation [57]. *In vitro*, NE has been shown to induce expression of the mucin protein MUC5AC by human epithelial cells [58,59].

In a recent study, NETs have been shown to be essential in mediating allergic asthma exacerbations elicited by rhinoviruses [18**] (Figure 1). Indeed, NETs were massively released in the lungs of rhinovirus-infected mice, and inhibition of NETs formation or degradation of NETs strongly diminished all the cardinal features of asthma exacerbations [18**]. Furthermore, in this model, injection of mouse dsDNA, a major NET component, was sufficient to recapitulate most of the hallmarks of exacerbation. Mechanistically, NETs were found to promote the recruitment of inflammatory dendritic cells to the lung, which mediate allergic response to house dust mites in mice. During rhinovirus-induced asthma exacerbations in humans, dsDNA levels strikingly correlated with NE BALF levels, with the levels of type 2 cytokines detected in nasal lavages and BALF, and with the clinical severity of the exacerbation [18**].

Conclusions and perspectives

Clinical evidence supports that neutrophils are recruited to the lungs of allergic asthmatic patients, especially during asthma symptomatic manifestations. In this context, the few studies that have looked at their potential implication in allergic asthma pathogenesis have underscored a potential pro-inflammatory, deleterious role, which facilitates type 2-mediated disease development. However, the contribution of neutrophils to allergic asthma and type 2 responses may have been understudied so far. Indeed, historically, they have been merely considered as first-line innate responders and effector cells in the context of type 17 host defence responses. Today, it is increasingly clear that neutrophils encompass distinct subsets and are endowed with many immunoregulatory properties. The use of high dimensional unbiased technologies, combined with novel transgenic tools that target specific neutrophil subsets should help uncovering their complex contributions to health, host defence and diseases in general, and to allergic disorders in particular.

Conflict of interest statement

Nothing declared.

References and recommended reading

Papers of particular interest, published within the period of review, have been highlighted as

- of special interest
- of outstanding interest

1. Borregaard N: **Neutrophils, from marrow to microbes**. *Immunity* 2010, **33**:657-670.
2. Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Chilvers ER: **Neutrophil kinetics in health and disease**. *Trends Immunol* 2010, **31**:318-324.
3. Silvestre-Roig C, Hidalgo A, Soehnlein O: **Neutrophil heterogeneity: implications for homeostasis and pathogenesis**. *Blood* 2016, **127**:2173-2181.
4. Ramirez-Velazquez C, Castillo EC, Guido-Bayardo L, Ortiz-Navarrete V: **IL-17-producing peripheral blood CD177+ neutrophils increase in allergic asthmatic subjects**. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2013, **9**:23.
5. Sigua JA, Buelow B, Cheung DS, Buell E, Hunter D, Klancnik M, Grayson MH: **CD49d-expressing neutrophils differentiate atopic from nonatopic individuals**. *J Allergy Clin Immunol* 2014, **133**:901-904.e5.
6. Adrover JM, Nicolás-Ávila JA, Hidalgo A: **Aging: a temporal dimension for neutrophils**. *Trends Immunol* 2016, **37**:334-345.
7. Sagiv JY, Michaeli J, Assi S, Mishalian I, Kisos H, Levy L, Damti P, Lumbroso D, Polyansky L, Sionov RV *et al.*: **Phenotypic diversity and plasticity in circulating neutrophil subpopulations in cancer**. *Cell Rep* 2015, **10**:562-573.
8. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A: **Neutrophil extracellular traps kill bacteria**. *Science* 2004, **303**:1532-1535.
9. Wenzel SE: **Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches**. *Nat Med* 2012, **18**:716-725.
10. Wenzel SE: **Asthma: defining of the persistent adult phenotypes**. *Lancet* 2006, **368**:804-813.
11. Ilmarinen P, Tuomisto LE, Kankaanranta H: **Phenotypes, risk factors, and mechanisms of adult-onset asthma**. *Mediators Inflamm* 2015 <http://dx.doi.org/10.1155/2015/514868>.
12. Simpson JL, Scott R, Boyle MJ, Gibson PG: **Inflammatory subtypes in asthma: assessment and identification using induced sputum**. *Respirology* 2006, **11**:54-61.
13. Schleich FN, Manise M, Sele J, Henket M, Seidel L, Louis R: **Distribution of sputum cellular phenotype in a large asthma cohort: predicting factors for eosinophilic vs neutrophilic inflammation**. *BMC Pulm Med* 2013, **13**:11.
14. Agrawal DK, Shao Z: **Pathogenesis of allergic airway inflammation**. *Curr Allergy Asthma Rep* 2010, **10**:39-48.
15. Lavinskiene S, Bajoruniene I, Malakauskas K, Jerock J, Sakalauskas R: **Sputum neutrophil count after bronchial allergen challenge is related to peripheral blood neutrophil chemotaxis in asthma patients**. *Inflamm Res* 2014, **63**:951-959.
16. Silvestri M, Oddera S, Sacco O, Balbo A, Crimi E, Rossi GA: **Bronchial and bronchoalveolar inflammation in single early and dual responders after allergen inhalation challenge**. *Lung* 1997, **175**:277-285.
17. Lommatzsch M, Julius P, Kuepper M, Garn H, Bratke K, Irmscher S, Luttmann W, Renz H, Braun A, Virchow JC: **The course of allergen-induced leukocyte infiltration in human and experimental asthma**. *J Allergy Clin Immunol* 2006, **118**:91-97.
18. Toussaint M, Jackson DJ, Swieboda D, Guedán A, Tsourouktsoglou T-D, Ching YM, Radermecker C, Makrinioti H, Aniscenko J, Bartlett NW *et al.*: **Host DNA released by NETosis promotes rhinovirus-induced type-2 allergic asthma exacerbation**. *Nat Med* 2017, **23**:681-691.

This study demonstrates the important role of NETs in asthma exacerbations. First, the authors show that NET components are released in nasal lavages of patients experiencing asthma exacerbations in response

to rhinovirus infection. Second, in a mouse model of asthma exacerbations, degradation or inhibition of NETs release by injecting DNase or an inhibitor of neutrophil elastase abrogate the development of characteristic features of asthma exacerbation.

19. Norzila MZ, Fakes K, Henry RL, Simpson J, Gibson PG: **Interleukin-8 secretion and neutrophil recruitment accompanies induced sputum eosinophil activation in children with acute asthma.** *Am J Respir Crit Care Med* 2000, **161**:769-774.
 20. John V, Fahay B, Kimb KW, Liub J, Homer A, Bousheya B: **Prominent neutrophilic inflammation in sputum from subjects with asthma exacerbation.** *J Allergy Clin Immunol* 1995, **95**:843-852.
 21. Martin RJ, Cicutto LC, Smith HR, Ballard RD, Szefer SJ: **Airways inflammation in nocturnal asthma.** *Am Rev Respir Dis* 1991, **143**:351-357.
 22. Hosoki K, Aguilera-Aguirre L, Brasier AR, Kurosky A, Boldogh I, Sur S: **Facilitation of allergic sensitization and allergic airway inflammation by pollen-induced innate neutrophil recruitment.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2015, **54**:81-90.
- Using a mouse model of ragweed pollen-induced airway allergy, the authors showed that inhibiting lung neutrophil recruitment prevented allergic sensitization and inflammation, which could be restored by adoptive transfer of wild type neutrophils. Production of neutrophil-attracting chemokines was shown to be dependent on TLR-4 expression in this model.
23. Hosoki K, Boldogh I, Aguilera-Aguirre L, Sun Q, Itazawa T, Hazra T, Brasier AR, Kurosky A, Sur S: **Myeloid differentiation protein 2 facilitates pollen- and cat dander-induced innate and allergic airway inflammation.** *J Allergy Clin Immunol* 2016, **137**:1506-1513.e2.
- In this report, the production of CXCL8 by human epithelial cells in response to clinically relevant allergens was shown to be dependent on TLR-4 and its co-receptor MD2. In addition, mice in which MD2 expression had been inhibited developed less allergic airway inflammation as compared to controls.
24. Post S, Nawijn MC, Hackett TL, Baranowska M, Gras R, Oosterhout AJM, van Heijik IH: **The composition of house dust mite is critical for mucosal barrier dysfunction and allergic sensitisation.** *Thorax* 2012, **67**:488-495.
 25. Kolaczowska E, Kubes P: **Neutrophil recruitment and function in health and inflammation.** *Nat Rev Immunol* 2013, **13**:159-175.
 26. Röschmann KIL, Luiten S, Jonker MJ, Breit TM, Fokkens WJ, Petersen A, van Druenen CM: **Timothy grass pollen extract-induced gene expression and signalling pathways in airway epithelial cells.** *Clin Exp Allergy* 2011, **41**:830-841.
 27. Taube C, Dakhama A, Rha Y-H, Takeda K, Joetham A, Park J-W, Balhorn A, Takai T, Poch KR, Nick JA et al.: **Transient neutrophil infiltration after allergen challenge is dependent on specific antibodies and FcγIII receptors.** *J Immunol* 2003, **170**:4301-4309.
 28. Oyoshi MK, He R, Li Y, Mondal S, Yoon J, Afshar R, Chen M, Lee DM, Luo HR, Luster AD et al.: **Leukotriene B4-driven neutrophil recruitment to the skin is essential for allergic skin inflammation.** *Immunity* 2012, **37**:747-758.
 29. Wenzel SE, Trudeau JB, Kaminsky DA, Cohn J, Martin RJ, Westcott JY: **Effect of 5-lipoxygenase inhibition on bronchoconstriction and airway inflammation in nocturnal asthma.** *Am J Respir Crit Care Med* 1995, **152**:897-905.
 30. Csoma Z, Kharitonov SA, Balint B, Bush A, Wilson NM, Barnes PJ: **Increased leukotrienes in exhaled breath condensate in childhood asthma.** *Am J Respir Crit Care Med* 2002, **166**:1345-1349.
 31. Biernacki WA, Kharitonov SA, Barnes PJ: **Increased leukotriene B4 and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of patients with exacerbations of COPD.** *Thorax* 2003, **58**:294-298.
 32. Evans DJ, Barnes PJ, Spaethe SM, Alstyne EL, van Mitchell MI, O'Connor BJ: **Effect of a leukotriene B4 receptor antagonist, LY293111, on allergen induced responses in asthma.** *Thorax* 1996, **51**:1178-1184.

33. Woytschak J, Keller N, Krieg C, Impellizzieri D, Thompson RW, Wynn TA, Zinkernagel AS, Boyman O: **Type 2 interleukin-4 receptor signaling in neutrophils antagonizes their expansion and migration during infection and inflammation.** *Immunity* 2016, **45**:172-184.

In this study, the authors provide experimental evidence that the type 2 cytokine IL-4 can act directly on neutrophils, through IL-4 receptor-dependent pathways, to limit their expansion in the periphery and their migration into the tissues. While not studied in the context of allergic asthma, it suggests that the lung Th2 microenvironment present during allergic asthma may also control neutrophil responses.

34. Galli SJ, Tsai M: **IgE and mast cells in allergic disease.** *Nat Med* 2012, **18**:693-704.
 35. Bettiol J, Radermecker M, Sele J, Henquet M, Cataldo D, Louis R: **Airway mast-cell activation in asthmatics is associated with selective sputum eosinophilia.** *Allergy* 2001, **54**:1188-1193.
 36. White MJV, Chinea LE, Pilling D, Gomer RH: **Protease activated-receptor 2 is necessary for neutrophil chemorepulsion induced by trypsin, trypsinase, or dipeptidyl peptidase IV.** *J Leukoc Biol* 2018, **103**:119-128.
 37. Stein MM, Hrusch CL, Gozdz J, Igartua C, Pivniouk V, Murray SE, Ledford JG, Marques dos Santos M, Anderson RL, Metwali N et al.: **Innate immunity and asthma risk in amish and hutterite farm children.** *N Engl J Med* 2016, **375**:411-421.
- Amish and Hutterite are two distinct human populations sharing the same ancestry, lifestyles but very different environmental exposure to bacterial lipopolysaccharides (LPS). Hutterite children, which are exposed to low levels of LPS, exhibit a higher asthma prevalence than Amish children, raised in LPS-rich homes. To investigate this correlation, the authors compared the innate immune response of both populations and identifies striking differences in neutrophil phenotype of the two populations. Particularly, blood neutrophils from Hutterite showed increased expression of CXCR4 and CD11b and decreased expression of CD11c. This study thus suggests an imprinting of the innate immune system by the environment, which may influence allergic asthma development.
38. Gounni AS, Lamkhioued B, Koussih L, Ra C, Renzi PM, Hamid Q: **Human neutrophils express the high-affinity receptor for immunoglobulin E (FcεRI): role in asthma.** *FASEB J* 2001, **15**:940-949.
 39. Alphonse MP, Saffar AS, Shan L, HayGlass KT, Simons FER, Gounni AS: **Regulation of the high affinity IgE receptor (FcεRI) in human neutrophils: role of seasonal allergen exposure and Th-2 cytokines.** *PLoS ONE* 2008, **3**:e1921.
 40. Ventura I, Vega A, Chacón P, Chamorro C, Aroca R, Gómez E, Bellido V, Puente Y, Blanca M, Monteseirín J: **Neutrophils from allergic asthmatic patients produce and release metalloproteinase-9 upon direct exposure to allergens.** *Allergy* 2014, **69**:898-905.
 41. Monteseirín J, Bonilla I, Camacho MJ, Chacón P, Vega A, Chaparro A, Conde J, Sobrino F: **Specific allergens enhance elastase release in stimulated neutrophils from asthmatic patients.** *Int Arch Allergy Immunol* 2003, **131**:174-181.
 42. Monteseirín J, Bonilla I, Camacho MJ, Conde J, Sobrino F: **IgE-dependent release of myeloperoxidase by neutrophils from allergic patients.** *Clin Exp Allergy* 2001, **31**:889-892.
 43. Monteseirín J, Chacón P, Vega A, El Bekay R, Alvarez M, Alba G, Conde M, Jiménez J, Asturias JA, Martínez A et al.: **Human neutrophils synthesize IL-8 in an IgE-mediated activation.** *J Leukoc Biol* 2004, **76**:692-700.
 44. Venge P, Byström J, Carlson M, Håkansson L, Karawaczyk M, Peterson C, Sevéus L, Trulsson A: **Eosinophil cationic protein (ECP): molecular and biological properties and the use of ECP as a marker of eosinophil activation in disease.** *Clin Exp Allergy* 1999, **29**:1172-1186.
 45. Monteseirín J, Camacho MJ, Montañó R, Llamas E, Conde M, Carballo M, Guardia P, Conde J, Sobrino F: **Enhancement of antigen-specific functional responses by neutrophils from allergic patients.** *J Exp Med* 1996, **183**:2571-2579.
 46. Mosca T, Menezes MCS, Silva AV, Stirbulov R, Forte WCN: **Chemotactic and phagocytic activity of blood neutrophils in allergic asthma.** *Immunol Invest* 2015, **44**:509-520.

47. Hartl D, Krauss-Etschmann S, Koller B, Hordijk PL, Kuijpers TW, Hoffmann F, Hector A, Eber E, Marcos V, Bittmann I *et al.*: **Infiltrated neutrophils acquire novel chemokine receptor expression and chemokine responsiveness in chronic inflammatory lung diseases.** *J Immunol Baltim Md 1950* 2008, **181**:8053-8067.
48. Papayannopoulos V: **Neutrophil extracellular traps in immunity and disease.** *Nat Rev Immunol* 2017 <http://dx.doi.org/10.1038/nri.2017.105>.
49. Yasui K, Kobayashi N, Yamazaki T, Koike K, Fukushima K, Taniuchi S, Kobayashi Y: **Neutrophilic inflammation in childhood bronchial asthma.** *Thorax* 2005, **60**:704-705.
50. Cataldo DD, Tournoy KG, Vermaelen K, Munaut C, Foidart J-M, Louis R, Noël A, Pauwels RA: **Matrix metalloproteinase-9 deficiency impairs cellular infiltration and bronchial hyperresponsiveness during allergen-induced airway inflammation.** *Am J Pathol* 2002, **161**:491-498.
51. Sevin CM, Newcomb DC, Toki S, Han W, Sherrill TP, Boswell MG, Zhu Z, Collins RD, Boyd KL, Goleniewska K *et al.*: **Deficiency of gp91phox inhibits allergic airway inflammation.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2013, **49**:396-402.
52. Vermaelen KY, Cataldo D, Tournoy K, Maes T, Dhulst A, Louis R, Foidart J-M, Noël A, Pauwels R: **Matrix metalloproteinase-9-mediated dendritic cell recruitment into the airways is a critical step in a mouse model of asthma.** *J Immunol* 2003, **171**:1016-1022.
53. Pothoven KL, Norton JE, Hulse KE, Suh LA, Carter RG, Rocci E, Harris KE, Shintani-Smith S, Conley DB, Chandra RK *et al.*: **Oncostatin M promotes mucosal epithelial barrier dysfunction, and its expression is increased in patients with eosinophilic mucosal disease.** *J Allergy Clin Immunol* 2015, **136**:737-746.e4.
54. Pothoven KL, Norton JE, Suh LA, Carter RG, Harris KE, Biyasheva A, Welch K, Shintani-Smith S, Conley DB, Liu MC *et al.*: **Neutrophils are a major source of the epithelial barrier disrupting cytokine oncostatin M in patients with mucosal airways disease.** *J Allergy Clin Immunol* 2017, **139**:1966-1978.e9.
55. Fritz DK, Kerr C, Fattouh R, Llop-Guevara A, Khan WI, Jordana M, Richards CD: **A mouse model of airway disease: oncostatin M-induced pulmonary eosinophilia, goblet cell hyperplasia, and airway hyperresponsiveness are STAT6 dependent, and interstitial pulmonary fibrosis is STAT6 independent.** *J Immunol* 2011, **186**:1107-1118.
56. Koga H, Miyahara N, Fuchimoto Y, Ikeda G, Waseda K, Ono K, Tanimoto Y, Kataoka M, Gelfand EW, Tanimoto M *et al.*: **Inhibition of neutrophil elastase attenuates airway hyperresponsiveness and inflammation in a mouse model of secondary allergen challenge: neutrophil elastase inhibition attenuates allergic airway responses.** *Respir Res* 2013, **14**:8.
57. Vovnow JA, Fischer BM, Malarkey DE, Burch LH, Wong T, Longphre M, Ho SB, Foster WM: **Neutrophil elastase induces mucus cell metaplasia in mouse lung.** *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol* 2004, **287**:L1293-L1302.
58. Kohri K, Ueki IF, Nadel JA: **Neutrophil elastase induces mucin production by ligand-dependent epidermal growth factor receptor activation.** *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol* 2002, **283**:L531-L540.
59. Shao MXG, Nadel JA: **Neutrophil elastase induces MUC5AC mucin production in human airway epithelial cells via a cascade involving protein kinase C, reactive oxygen species, and TNF- α -converting enzyme.** *J Immunol* 2005, **175**:4009-4016.
60. Jorch SK, Kubes P: **An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease.** *Nat Med* 2017, **23**:279-287.
61. Manise M, Holtappels G, Crombruggen KV, Schleich F, Bachert C, Louis R: **Sputum IgE and cytokines in asthma: relationship with sputum cellular profile.** *PLOS ONE* 2013, **8**:e58388.
62. Maes T, Cobos FA, Schleich F, Sorbello V, Henket M, Preter KD, Bracke KR, Conickx G, Mesnil C, Vandesompele J *et al.*: **Asthma inflammatory phenotypes show differential microRNA expression in sputum.** *J Allergy Clin Immunol* 2016, **137**:1433-1446.



ARTICLE

Epithelial RABGEF1 deficiency promotes intestinal inflammation by dysregulating intrinsic MYD88-dependent innate signaling

Sophie El Abbas^{1,2}, Coraline Radermecker^{1,2}, Qiang Bai¹, Charline Beguin¹, Joey Schyns^{1,2}, Margot Meunier^{1,2}, Dimitri Pirotin^{2,3}, Christophe J. Desmet², Marie-Alice Meuwis^{4,5}, Tatiana Art², Edouard Louis^{4,5}, See-Ying Tam^{6,7}, Mindy Tsai^{6,7}, Fabrice Bureau^{2,3,8}, Stephen J. Galli^{6,7,9} and Thomas Marichal^{1,2,8}

Intestinal epithelial cells (IECs) contribute to the regulation of intestinal homeostasis and inflammation through their interactions with the environment and host immune responses. Yet our understanding of IEC-intrinsic regulatory pathways remains incomplete. Here, we identify the guanine nucleotide exchange factor RABGEF1 as a regulator of intestinal homeostasis and innate pathways dependent on IECs. Mice with IEC-specific *Rabgef1* deletion (called *Rabgef1*^{IEC-KO} mice) developed a delayed spontaneous colitis associated with the local upregulation of IEC chemokine expression. In mouse models of colitis based on Interleukin-10 deficiency or dextran sodium sulfate (DSS) exposure, we found that IEC-intrinsic RABGEF1 deficiency exacerbated development of intestinal pathology and dysregulated IEC innate pathways and chemokine expression. Mechanistically, we showed that RABGEF1 deficiency in mouse IECs in vitro was associated with an impairment of early endocytic events, an increased activation of the p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)-dependent pathway, and increased chemokine secretion. Moreover, we provided evidence that the development of spontaneous colitis was dependent on microbiota-derived signals and intrinsic MYD88-dependent pathways in vivo. Our study identifies mouse RABGEF1 as an important regulator of intestinal inflammation, MYD88-dependent IEC-intrinsic signaling, and chemokine production. This suggests that RABGEF1-dependent pathways represent interesting therapeutic targets for inflammatory conditions in the gut.

Mucosal Immunology (2020) 13:96–109; <https://doi.org/10.1038/s41385-019-0211-z>

INTRODUCTION

The intestinal mucosa is particularly exposed to microorganisms and foreign antigens. Intestinal homeostasis thus relies on finely tuned interactions between the environment, intestinal epithelial cells (IECs) and host immune responses, which allow the host to assimilate nutrients and to tolerate commensal microorganisms and dietary antigens, while mounting appropriate defense responses against pathogens.^{1–3}

IECs critically contribute to the regulation of intestinal homeostasis and inflammation.^{2,3} Indeed, in addition to forming a physical barrier and eliciting efficient secretory defenses, IECs express a wide range of pattern recognition receptors (PRRs)^{2,4–6} that can sense microbiota-derived signals and integrate them into appropriate homeostatic or defensive responses.^{2,3,7} The abundance of symbiotic microorganisms necessitates that IECs express negative regulators of PRR signaling pathways in order to avoid aberrant immune responses and a break of tolerance, which can be associated with chronic inflammatory conditions such as inflammatory bowel diseases (IBDs). Experimental

models of IBDs have substantially contributed to our understanding of IBD pathogenesis, which is thought to be driven by interactions between microbial, environmental, and host genetic factors.^{2,5,8–12}

RAB guanine nucleotide exchange factor 1 (RABGEF1) was first identified as a GDP/GTP exchange factor for the small GTPase Rab5, which regulates endocytosis and early endosome trafficking events.^{13–17} RABGEF1 contains several functional domains, including a N-terminal A20-like zinc finger domain that can exhibit E3 ubiquitin ligase activity^{18,19} and a Vps9 domain promoting GEF activity for Rab5.^{13–15} RABGEF1 is critical for health, as globally RABGEF1-deficient mice exhibit perinatal mortality.²⁰ In addition, we showed that RABGEF1 expression within skin epithelial cells (i.e., keratinocytes) is required to sustain optimal epidermal barrier functions and skin homeostasis in mice.²¹ Based on evidence suggesting a homeostatic role of keratinocyte-intrinsic RABGEF1, we have speculated that this protein could also act as a regulator of homeostasis and inflammation at other epithelial surfaces, such as the intestine. In that site, colonization by microorganisms

¹Laboratory of Immunophysiology, GIGA Institute, Liege University, Liège, Belgium; ²Faculty of Veterinary Medicine, Liege University, Liège, Belgium; ³Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, GIGA Institute, Liege University, Liège, Belgium; ⁴Gastroenterology Unit, University Hospital (CHU), Liege University, Liège, Belgium; ⁵Laboratory of Translational Gastroenterology, GIGA Institute, Liege University, Liège, Belgium; ⁶Department of Pathology, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA, USA; ⁷Sean N. Parker Center for Allergy and Asthma Research, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA, USA; ⁸WELBIO, Walloon Excellence in Life Sciences and Biotechnology, Wallonia, Belgium and ⁹Department of Microbiology and Immunology, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA, USA

Correspondence: Thomas Marichal (t.marichal@uliege.be)

These authors contributed equally: Sophie El Abbas, Coraline Radermecker.

Received: 5 December 2018 Revised: 18 September 2019 Accepted: 28 September 2019

Published online: 18 October 2019



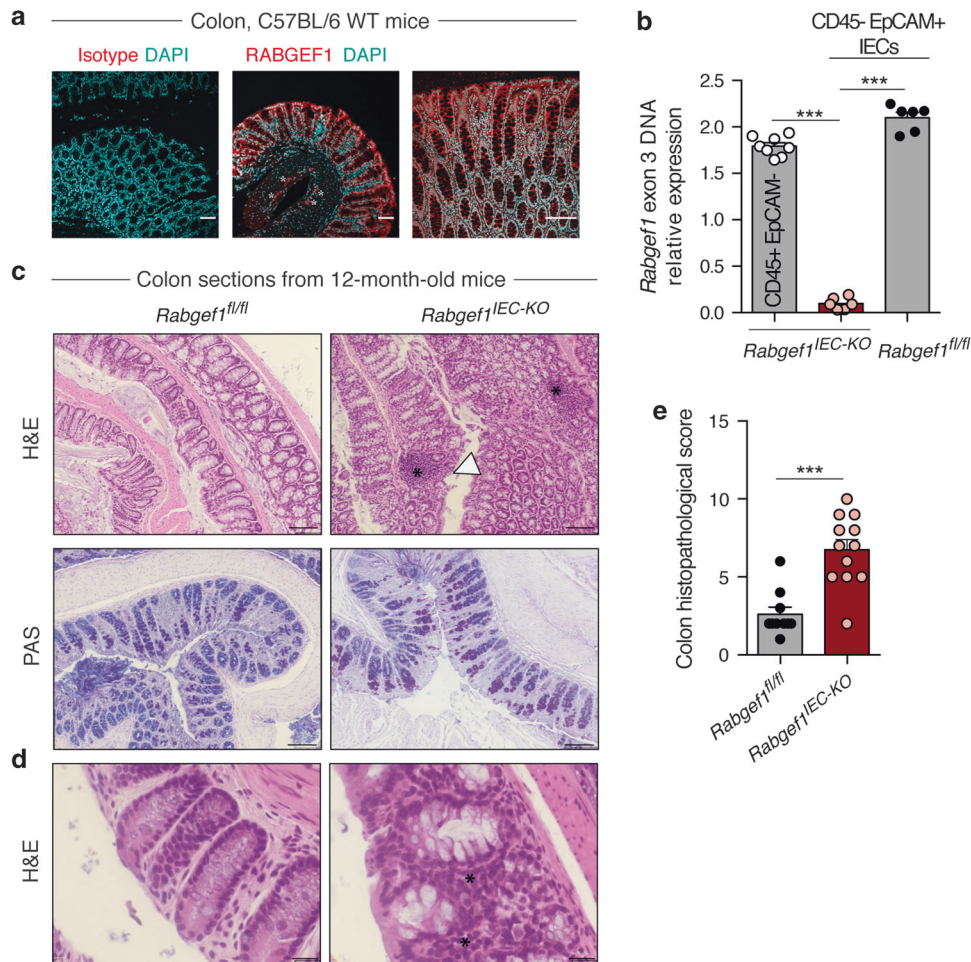


Fig. 1 Spontaneous colitis development in aged C57BL/6 mice with conditional depletion of *Rabgef1* in IECs (i.e., *Rabgef1*^{IEC-KO} mice). **a** Representative RABGEF1 staining of colon sections from 8-week-old WT C57BL/6 mice. Pictures are representative of 1 of >6 mice analyzed, each of which gave similar results. **b** Efficiency and specificity of Cre-mediated *Rabgef1* exon 3 deletion assessed by quantitative PCR in CD45⁺EpCAM⁺ leukocytes and CD45⁺EpCAM⁺ IECs. **c, d** Representative hematoxylin & eosin (H&E, top panels) and Periodic Acid Schiff (PAS, bottom panels) stainings of colon sections from 12-month-old *Rabgef1*^{IEC-KO} and littermate controls. Asterisks indicate inflammatory cell infiltrates and arrowhead shows eroded epithelial areas. **e** Colon histopathological score (n = 10–12 mice/group). **b, e** Data are shown as mean + SEM, as well as individual values, and are pooled from 2 (**b**) or >3 (**e**) independent experiments. P values were calculated using a one-way ANOVA with Tukey's post hoc tests (**b**) and a Mann–Whitney test (**e**). ***P < 0.001. Scale bars: 100 μ m (**a, c**); 20 μ m (**d**). WT wild-type

requires tight regulation of the intestinal epithelium in order to cope with the myriad of microbial stimuli and antigens.

RESULTS

IEC-specific *Rabgef1* deletion promotes a spontaneous and delayed colitis

In the mouse colon, RABGEF1 protein was found to be highly expressed in IECs (Fig. 1a) as well as in discrete cell clusters located in the submucosa, which may correspond to the myenteric plexus (Fig. 1a, asterisks). To investigate the functions of IEC-intrinsic RABGEF1 in vivo, *Villin-Cre*⁺; *Rabgef1*^{fl/fl} mice with conditional *Rabgef1* deletion within IECs were generated (called *Rabgef1*^{IEC-KO} mice hereafter) (Fig. 1b). Under conventional conditions of housing, *Rabgef1*^{IEC-KO} mice were born with a Mendelian ratio and did not develop any mortality (Supplementary Fig. 1a), weight loss (Supplementary Fig. 1b) or macroscopic intestinal abnormalities (Supplementary Fig. 1c) until the age of 12 months. Histopathological analyses of colon sections from 10-week-old mice did not reveal development of intestinal pathology in *Rabgef1*^{IEC-KO} mice (Supplementary Fig. 1d, e). However, similar analyses performed on 12-month-old mice showed signs of moderate inflammation (i.e., mucosal and submucosal

inflammatory infiltrates) and epithelial damage (i.e., hyperplasia and erosion without goblet cell loss) in the colon of *Rabgef1*^{IEC-KO} mice as compared to controls (Fig. 1c–e), while no abnormalities were found in the small intestine (Supplementary Fig. 2a–c). We also analyzed other organs of aged *Rabgef1*^{IEC-KO} mice and did not find any obvious histological abnormalities (Supplementary Fig. 2d–l).

Epithelial RABGEF1 deficiency results in IEC-specific alteration of cytokine expression without systemic effects
Next, we characterized IEC-intrinsic immune and barrier functions and features of systemic immune activation in *Rabgef1*^{IEC-KO} and littermate *Rabgef1*^{fl/fl} mice. Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) analyses of IECs from 12-month-old mice revealed that RABGEF1-deficient IECs exhibited a higher expression of *Tnfa*, *Ccl2*, *Cxcl1*, and *Cxcl2* as compared to the littermate counterparts, while the expression of other cytokines (*Il6*, *Vegfa*, *Ccl11*, and *Ccl5*) and *Muc2* (coding for Mucin 2) was not affected by RABGEF1 deficiency (Fig. 2a). Such effects were however not observed in IECs from 10-week-old *Rabgef1*^{IEC-KO} mice (Supplementary Fig. 3). To evaluate intestinal permeability to luminal contents, plasma levels of fluorescein isothiocyanate (FITC) were measured following oral

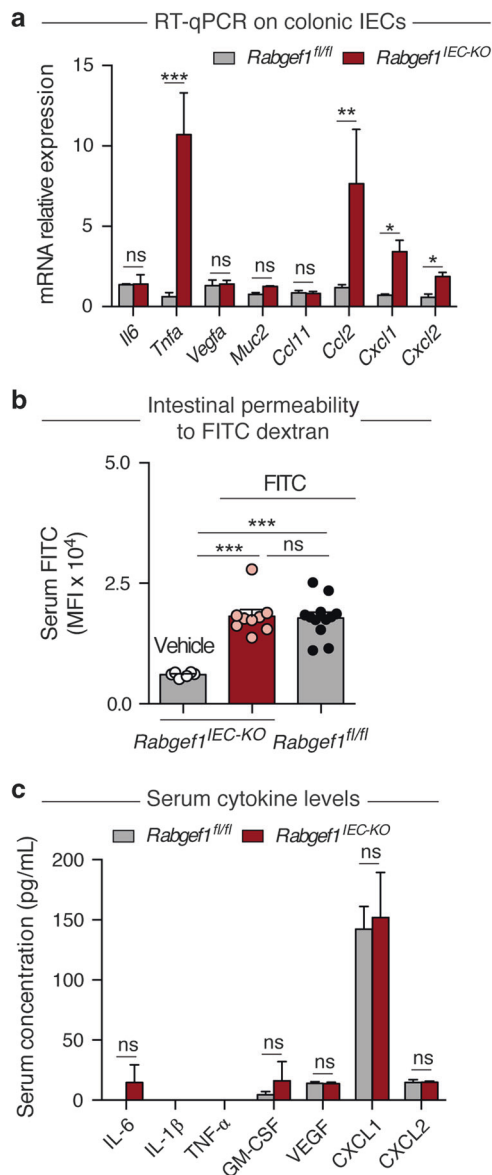


Fig. 2 Assessment of IEC-specific immune and barrier functions and systemic inflammation in 12-month-old *Rabgef1^{IEC-KO}* mice. **a** IECs were isolated from *Rabgef1^{IEC-KO}* and littermate control mice and expression of the indicated genes was assessed by RT-qPCR ($n = 4$ mice/group). **b** Quantification of intestinal permeability: serum levels of FITC fluorescence 4 h after FITC-dextran gastric gavage ($n = 6-12$ mice/group). **c** Cytokine concentrations measured by Luminex assay in the sera of mice ($n = 7-8$ mice/group). Concentration values below the detection threshold are depicted as zero values. Data are shown as mean \pm SEM and are pooled from 2 independent experiments, each of them giving similar results. P values were calculated using a two-way (**a**, **c**) or a one-way (**b**) ANOVA with Tukey's post hoc tests. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns not significant ($P > 0.05$). FITC fluorescein isothiocyanate

administration of FITC-dextran. Notably, no differences were found between 12-month-old *Rabgef1^{IEC-KO}* and littermate controls (Fig. 2b). Third, serum levels of several cytokines were not altered by IEC-restricted RABGEF1 deficiency in such mice (Fig. 2c). These results indicate that epithelial RABGEF1 deficiency was associated with local changes in IEC innate responses, while no evidence of impaired intestinal permeability or systemic inflammation were observed.

Epithelial RABGEF1 limits colon inflammation and pathology in IL-10-deficient mice

The genetic model of colitis based on IL-10 deficiency has been extensively used to help dissecting the mechanisms of IBD.²² It is thought to influence IEC responses²³⁻²⁵ and promotes a spontaneous, microbiota-dependent colitis.^{26,27} To characterize the effects of IL-10 deficiency on IECs in our housing conditions, we performed mRNA-sequencing (RNA-seq) of FACS-sorted colonic IECs isolated from 10-week-old *Il10^{-/-}* and littermate *Il10^{+/+}* mice and found that IECs clustered according to their genotype (i.e., *Il10^{-/-}* or *Il10^{+/+}* mice) (Supplementary Fig. 4a, b). In addition, we found a significant enrichment, among genes upregulated in *Il10^{-/-}* IECs, of transcripts implicated in oxidative phosphorylation, protein translation and export, and ribosome function (Supplementary Fig. 4c, d), as well as MHC class II-related genes, chemokines, and genes implicated in the response to lipopolysaccharide (LPS) and the negative regulation of inflammation (Supplementary Fig. 4e). Conversely, genes downregulated in *Il10^{-/-}* IECs were shown to be involved in adherens/apical junctions, digestion or transmembrane transporter activity (Supplementary Fig. 4c, d). These results support the idea that IECs isolated from *Il10^{-/-}* mice exhibit increased metabolic and innate immune activities associated with impaired barrier and digestive functions.

In order to address the contribution of IEC-intrinsic RABGEF1 in IL-10 deficiency-induced intestinal inflammation, *Rabgef1^{IEC-KO}* mice were generated on the *Il10^{-/-}* background, and the development of intestinal pathology was evaluated. At the age of 3-4 months, the weight and the colon lengths were not significantly different between *Il10^{-/-}*; *Rabgef1^{IEC-KO}* and control *Il10^{-/-}*; *Rabgef1^{fl/fl}* mice (Supplementary Fig. 5). However, *Il10^{-/-}*; *Rabgef1^{IEC-KO}* mice exhibited exacerbated signs of colon inflammation and damage as compared to controls (Fig. 3). Indeed, microscopic analysis of colon sections revealed that *Il10^{-/-}*; *Rabgef1^{IEC-KO}* mice had more severe inflammation (associated with transmural and dense inflammatory infiltrates), as well as more epithelial damage, sometimes developing into extensive ulcerated areas (Fig. 3a). Immunofluorescent staining of neutrophils with anti-myeloperoxidase (MPO) antibodies showed a higher number of neutrophils infiltrating the colon of *Il10^{-/-}*; *Rabgef1^{IEC-KO}* mice as compared to controls (Fig. 3b, c). In addition, a substantial and consistent loss of mucus-producing goblet cells was observed (Fig. 3d). As a consequence, a higher histopathological score was observed in the colon of *Il10^{-/-}*; *Rabgef1^{IEC-KO}* mice vs. controls (Fig. 3e).

Within IECs, RABGEF1 deficiency was associated with increased expression of genes coding for pro-inflammatory cytokines (*Il6*, *Tnfa*, *Vegfa*, *Ccl11*, *Ccl2*, *Cxcl1*, and *Cxcl2*) and reduced expression of the *Muc2* gene, consistent with the loss of goblet cells (Fig. 4a). In addition, like the situation observed in 12-month-old *Rabgef1^{IEC-KO}* and littermates, intestinal permeability to FITC-dextran and systemic levels of cytokines were not affected by RABGEF1 deficiency in this model (Fig. 4b, c).

Epithelial RABGEF1 regulates susceptibility to DSS-induced colon damage and pathology

Next, we assessed whether IEC-intrinsic RABGEF1 expression could be involved in the regulation of intestinal inflammation triggered by exogenous stimuli such as DSS. We used a model based on administration of 3% DSS in drinking water for 7 days, which promoted acute increases in numbers of neutrophils, eosinophils, monocytes/macrophages, and dendritic cells as compared to the baseline, a profile that was not observed in 10-week-old *Il10^{-/-}* mice (Supplementary Fig. 6). Despite these differences between the two models, the transcriptomic profile of DSS-exposed colonic IECs evaluated by RNA-seq was strikingly similar to the one of IECs isolated from age-matched *Il10^{-/-}* animals (Supplementary Fig. 7).

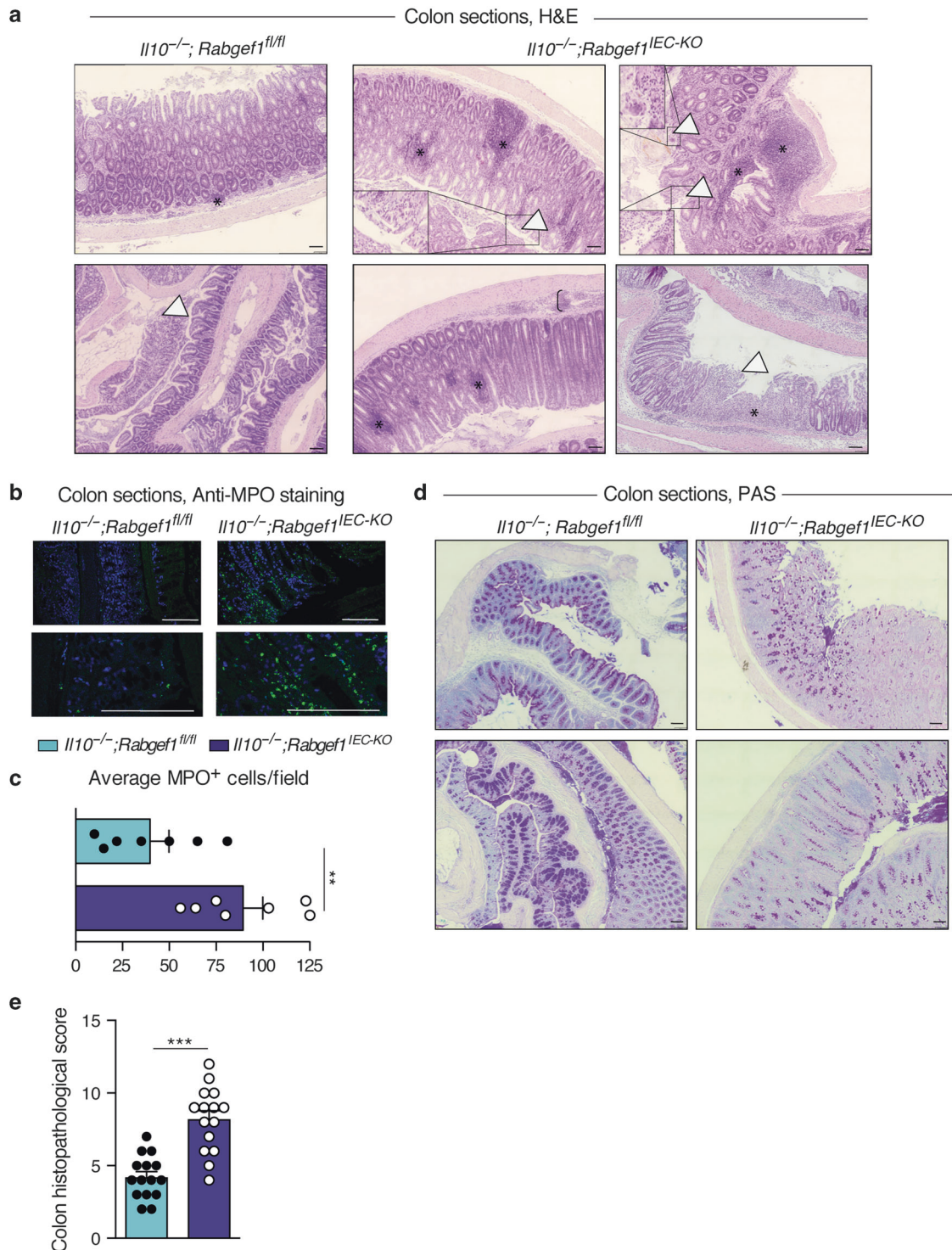


Fig. 3 Contribution of epithelial RABGEF1 to the regulation of intestinal pathology in IL-10-deficient mice. Comparisons between 3- and 4-month-old *Rabgef1^{IEC-KO}* and *Rabgef1^{fl/fl}* (control) mice raised on the *Il10^{-/-}* background are shown. **a** Representative hematoxylin & eosin (H&E) staining of colon sections. Asterisks indicate focal inflammatory cell infiltrates, arrowheads show, at higher power, ulcerated epithelial areas, and brackets show areas of severe transmurial inflammation. **b** Representative confocal microscopy pictures of myeloperoxidase (MPO—green) staining of colon sections. DAPI⁺ nuclei are blue. **c** Quantification of average MPO⁺ cells per field ($n = 7$ mice/group). **d** Representative Periodic Acid Schiff (PAS) staining of colon sections. **e** Colon histopathological score ($n = 15$ mice/group). Data are shown as mean + SEM, as well as individual values, and are pooled from 2 (c) or >3 (e) independent experiments. P values were calculated by a Mann–Whitney test $^{**}P < 0.01$; $^{***}P < 0.001$. Scale bars: 100 μ m

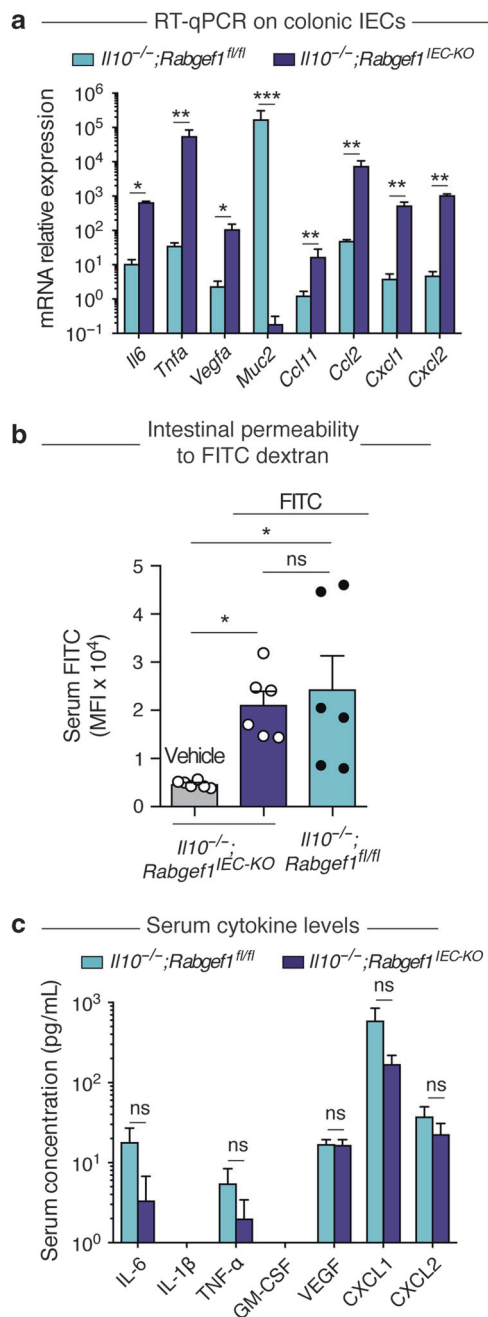


Fig. 4 Contribution of epithelial RABGEF1 to the regulation of IEC innate responses, intestinal permeability, and systemic inflammation in IL-10-deficient mice. Comparisons between 3-to-4-month-old $Rabgef1^{IEC-KO}$ and $Rabgef1^{fl/fl}$ (control) mice raised on the $Il10^{-/-}$ background are shown. **a** IECs were isolated and expression of the indicated genes was assessed by RT-qPCR ($n=4$ mice/group). **b** Quantification of intestinal permeability: serum levels of FITC fluorescence 4 h after FITC-dextran gastric gavage ($n=6$ mice/group). **c** Cytokine concentrations measured by Luminex assay in the sera of mice ($n=6-7$ mice/group). Concentration values below the detection threshold are depicted as zero values. Data are shown as mean \pm SEM, as well as individual values in (g), and are pooled from two independent experiments, each of them giving similar results. P values were calculated by a two-way (a, c) or a one-way (b) ANOVA with Tukey's post hoc tests. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns not significant ($P > 0.05$). FITC fluorescein isothiocyanate

Based on such findings, we decided to evaluate the contribution of epithelial RABGEF1 using this model.

Compared to $Rabgef1^{fl/fl}$ mice, $Rabgef1^{IEC-KO}$ mice exhibited liquid, sticky and bloody feces (Fig. 5a) and significantly shorter and highly inflamed colons (Fig. 5b, c). Histopathological examination of colons from DSS-treated $Rabgef1^{IEC-KO}$ mice revealed increased epithelial hyperplasia and crypt elongation, the presence of dense granulocyte-rich cell infiltrates in the submucosa, and extensive epithelial ulceration and transmural inflammation when compared to DSS-treated controls (Fig. 5d, e), resulting in a more severe histopathological score (Fig. 5f). Two days after DSS treatment, when intestinal permeability to FITC-dextran is known to be affected by DSS,²⁸ permeability to FITC-dextran was, again, not different between $Rabgef1^{IEC-KO}$ and control mice (Fig. 5g). These results indicate that, similar to its role in the IL-10 deficiency model, RABGEF1 expression is also critical in limiting DSS-induced inflammation and damage. Altogether, our results so far support the idea that RABGEF1 deficiency promotes development of intestinal inflammation and locally exacerbates IEC innate responses.

RABGEF1 modulates intrinsic expression of genes implicated in IEC physiology, endocytosis, and innate immunity. To gain mechanistic insights into RABGEF1-dependent regulation of IEC responses, we performed RNA-seq analyses of FACS-sorted IECs from 10-week-old $Il10^{-/-}; Rabgef1^{IEC-KO}$ and littermate $Il10^{-/-}; Rabgef1^{fl/fl}$ mice. As shown in Fig. 6a, RABGEF1-deficient IECs were separated from the control counterparts across principal component (PC)1 (explaining 40% of the variance between samples). Using an adjusted P value (P_{adj}) $< 10^{-2}$, a total of 102 genes were found to be differentially expressed (DE) between $Il10^{-/-}; Rabgef1^{IEC-KO}$ and $Il10^{-/-}; Rabgef1^{fl/fl}$ IECs (Fig. 6b and Supplementary Table 1).

First, on the basis of MouseNet v2 network²⁹ and a bibliographical search, we found that several genes implicated in transmembrane transporter activity and metabolic processing of nutrients were downregulated in RABGEF1-deficient IECs (Fig. 6c), supporting the idea that IECs' physiological functions were impaired when RABGEF1 was absent. Conversely, genes implicated in the regulation of innate immune pathways, such as the MAPK pathways or the NF- κ B pathway, were upregulated in RABGEF1-deficient IECs (Fig. 6c).

Second, gene set enrichment analysis (GSEA), used to identify biological signatures in IECs from $Il10^{-/-}; Rabgef1^{IEC-KO}$ mice as compared to those from $Il10^{-/-}; Rabgef1^{fl/fl}$ mice, revealed a significant enrichment, among genes downregulated in RABGEF1-deficient IECs, of genes involved in endocytic events (Fig. 6d). We also assessed the gene expression profiles of IECs from $Rabgef1^{IEC-KO}$ and littermate control mice on the wild-type (WT) background by RNA-seq (Supplementary Fig. 8a, b and Supplementary Table 2). Notably, we found a highly significant similarity in gene expression profiles of IECs from $Rabgef1^{IEC-KO}$ mice under the IL-10-deficient and those under the WT background (Supplementary Fig. 8c), as well as a downregulation of endocytosis-related transcripts in IECs from $Rabgef1^{IEC-KO}$ mice as compared to the control counterparts (Supplementary Fig. 8d). These data support the conclusion that IECs exhibit alterations of their endolysosomal system when RABGEF1 is absent.

RABGEF1-deficient IECs display endosomal abnormalities in vitro. To support our RNA-seq-based observations at the protein level, we took advantage of immortalized mouse IECs, which display structural features of primary IECs and can functionally respond to microbial stimulation.³⁰ Lentiviral-based expression of RABGEF1 knockdown was induced in IECs (Supplementary Figs. 9 and 10). Using antibodies directed against the RABGEF1 endocytic effector Rab5, we showed that the distribution of Rab5 staining at steady-

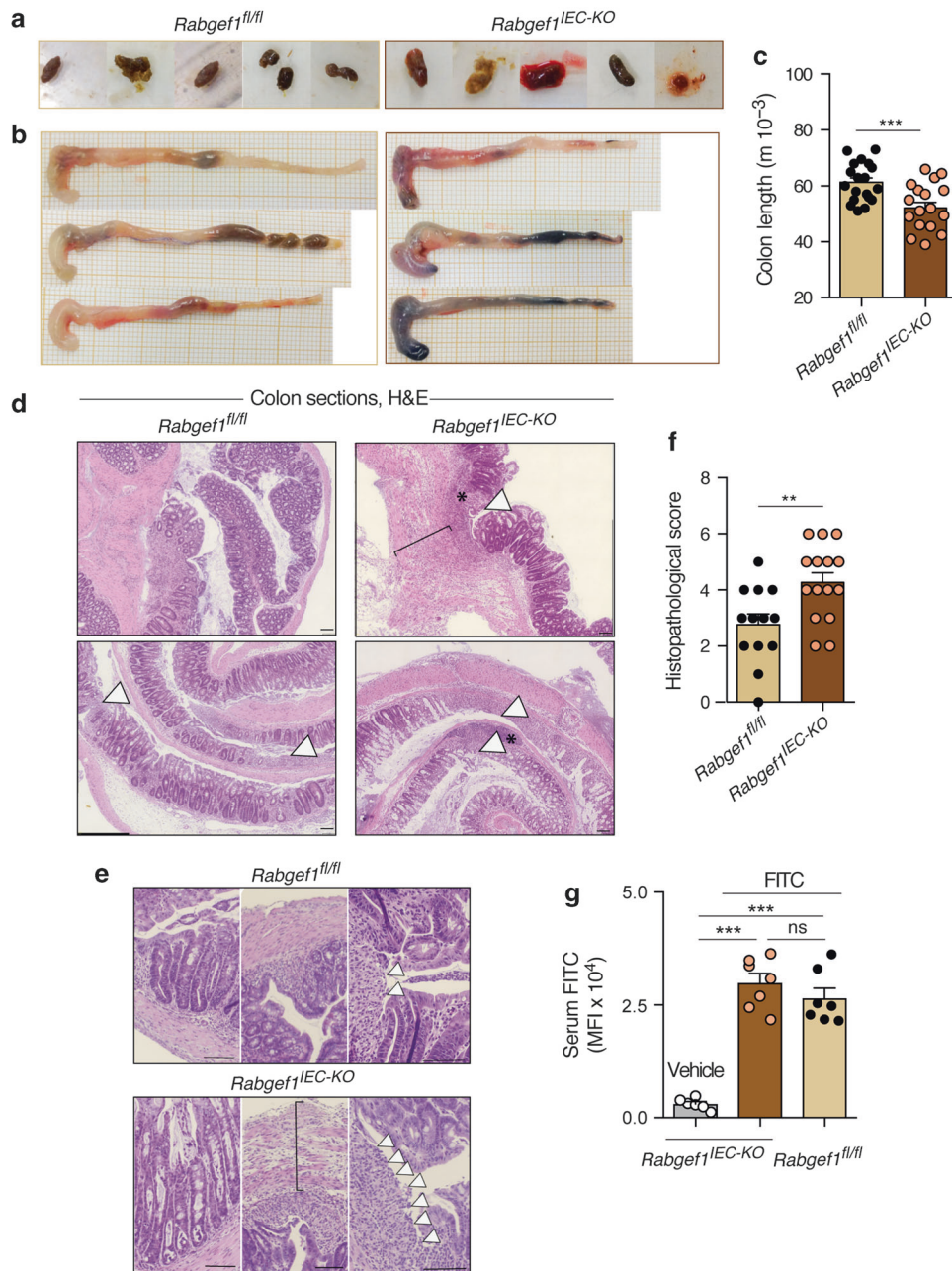


Fig. 5 Contribution of epithelial RABGEF1 to DSS-induced inflammation and damage. **a–f** Comparisons between 8-to-12-week-old female *Rabgef1^{IEC-KO}* and *Rabgef1^{fl/fl}* littermate control mice after 7 days of DSS exposure (3% in drinking water) are shown. **a, b** Photographs of feces (**a**) and cece and colons (**b**) 7 days after DSS treatment. Pictures are representative of 3 of >15 mice analyzed, each of them giving similar results. **c** Colon length ($n = 17$ –18 mice/group). **d, e** Representative H&E staining of colon sections at lower (**d**) and higher (**e**) power. Asterisks indicate focal inflammatory cell infiltrates, arrowheads show ulcerated areas of the epithelium, and the bracket encompass areas of severe transmurial inflammation. **f** Histopathological score assessed in the colon ($n = 13$ –15 mice/group). **g** Quantification of intestinal permeability 2 days after DSS treatment: serum levels of FITC fluorescence 4 h after FITC-dextran gastric gavage ($n = 6$ –7 mice/group). **c, f, g** Data are shown as mean + SEM, as well as individual values, and are pooled from 3 (**c, f**) or 2 (**g**) independent experiments. *P* values were calculated by a two-tailed unpaired Student's *t* test (**c**), a Mann–Whitney test (**f**) or a one-way ANOVA with Tukey's post hoc tests (**g**). **P* < 0.01; ****P* < 0.001; ns not significant (*P* > 0.05). Scale bars: 100 μ m. FITC fluorescein isothiocyanate

state was markedly different between RABGEF1-sufficient vs. RABGEF1-deficient IECs, with Rab5 being more diffusely distributed and less structurally organized when RABGEF1 was absent (Fig. 7a). After 60 min of LPS stimulation of RABGEF1-sufficient IECs, Rab5 staining intensity was increased and concentrated in polarized areas of the cell (Fig. 7a). Conversely, Rab5 staining remained more diffuse and less polarized in LPS-stimulated RABGEF1-deficient IECs (Fig. 7a).

In addition, we assessed the levels of early endosome antigen-1 (EEA-1) protein in RABGEF1-sufficient and RABGEF1-deficient IECs by Western blotting. EEA-1 is an early endosomal marker and effector of Rab5 whose levels have been shown to be reduced in Rab5-deficient cells¹⁷. We found that EEA-1 levels significantly increased following LPS stimulation of RABGEF1-sufficient IECs, supporting the occurrence of early endosomal events following LPS stimulation (Fig. 7b, c). By contrast, we found that EEA-1 levels

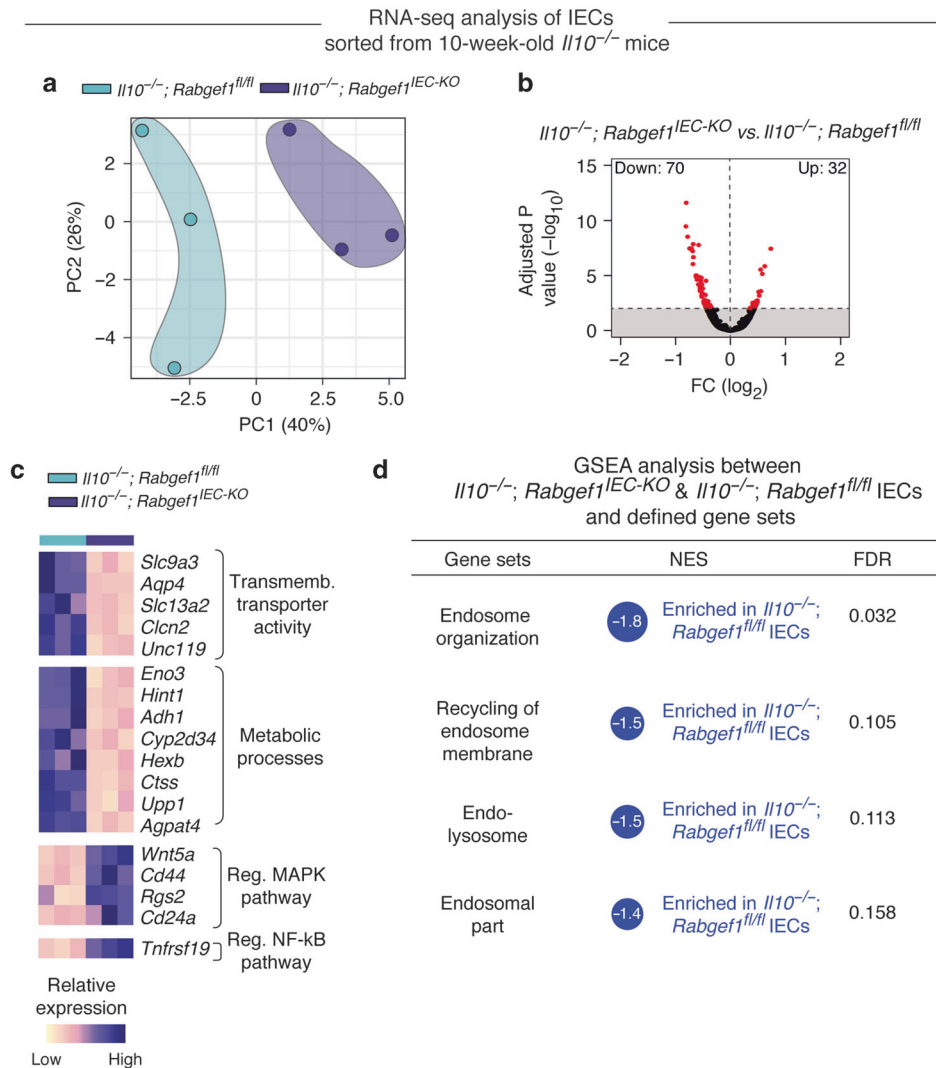


Fig. 6 RNA-seq analyses of colonic IECs isolated from 10-week-old *Il10*^{-/-}; *Rabgef1*^{IEC-KO} and *Il10*^{-/-}; *Rabgef1*^{fl/fl} mice. **a** Two-dimensional PCA comparing RABGEF1-deficient (*Rabgef1*^{IEC-KO}) and RABGEF1-sufficient (*Rabgef1*^{fl/fl}) IECs from *Il10*^{-/-} mice. Percentages indicate the variability explained by each component. *n* = 3 replicates/group, each replicate representing a pool of IECs isolated from three mice. **b** Volcano plot depicting the DE genes between RABGEF1-deficient and RABGEF1-sufficient IECs from *Il10*^{-/-} mice. DE genes with a *P*_{adj} value < 10⁻² are colored in red. **c** Heatmaps showing examples of significantly DE genes within individual samples. Genes are grouped according to their implication in several biological responses. **d** GSEA comparing the transcriptome of IECs from *Il10*^{-/-}; *Rabgef1*^{IEC-KO} and *Il10*^{-/-}; *Rabgef1*^{fl/fl} mice with defined gene sets. Circle size is proportional to the normalized enrichment score (NES), whose numeric value is also provided. The false-discovery rates (FDR) are also indicated

did not increase after LPS stimulation in RABGEF1-deficient IECs (Fig. 7b, c). Altogether, these data indicate that Rab5-dependent endocytic events occur in IECs after LPS stimulation but that RABGEF1 deficiency disrupts such endocytic events.

RABGEF1 regulates IEC-intrinsic p38-dependent signaling and chemokine production

Next, we examined the signaling pathways mediating the interaction of LPS and the Toll like receptor (TLR)4. Upon LPS stimulation, RABGEF1 knockdown had no effects on the levels of phosphorylation of IκBα, an inhibitor of NF-κB whose phosphorylation is required for NF-κB activation (Fig. 8a, b).³¹ While increased levels of phosphorylated ERK were noted in RABGEF1 knockdown IECs, such activation effect was not restored in RABGEF1-rescued IECs (Fig. 8a, b). However, after 5 or 15 min of LPS stimulation, RABGEF1 knockdown IECs exhibited increased phosphorylation levels of p38 MAPK as compared to those in RABGEF1-sufficient IECs, a signaling activation event that was not observed when RABGEF1 expression was restored (Fig. 8a, b).

Functionally, such activation was associated with an increased ability of RABGEF1 knockdown IECs to produce the chemokines CCL2, CCL11, CXCL1, and CXCL2 as compared to the control or RABGEF1-rescued IECs (Fig. 8c). Altogether, these data support the idea that RABGEF1 influences the TLR4-mediated p38 MAPK-dependent signaling pathways and their associated productions of several chemokines in IECs.

Intestinal inflammation in *Rabgef1*^{IEC-KO} mice is mediated by intrinsic MYD88-dependent signaling and microbe-derived signals MYD88 mediates the signaling responses induced by activation of IL-1/IL-18/Toll receptor superfamily members to induce activation of NF-κB and MAPK pathways leading to the release of pro-inflammatory mediators.³² Since RABGEF1 regulates the p38 MAPK pathway in response to LPS in vitro, which signals through MYD88, we wondered whether MYD88 signaling contributed to the phenotype observed in aged *Rabgef1*^{IEC-KO} mice. In order to test this, we generated and analyzed *Rabgef1*/Myd88^{IEC-KO} mice, in which IECs lack both MYD88 and RABGEF1. Notably, deletion of

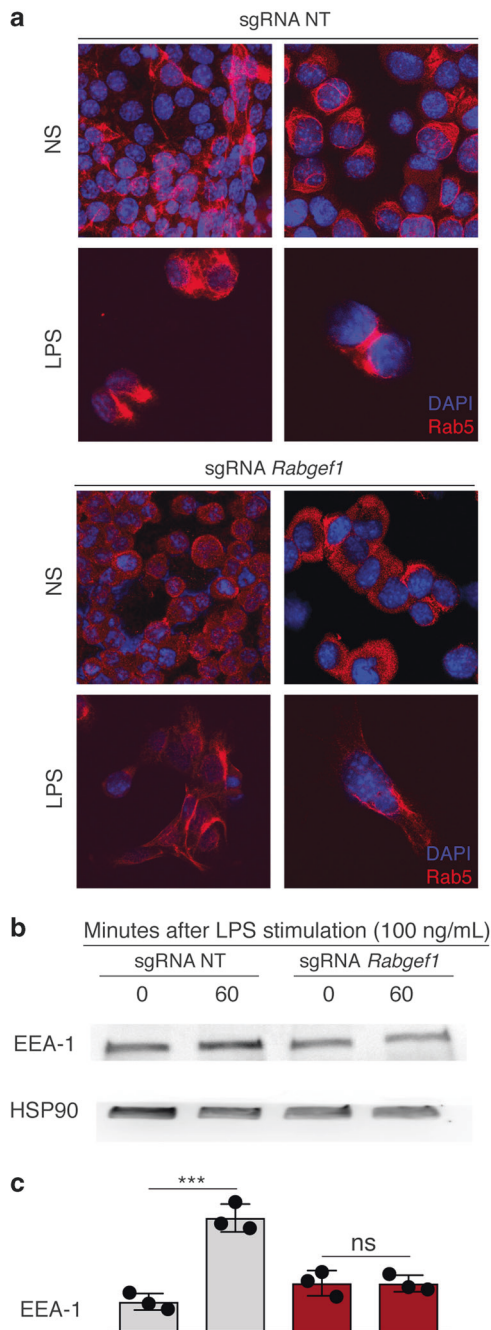


Fig. 7 Endosomal abnormalities in RABGEF1-deficient IECs in vitro. Immortalized primary mouse IECs transduced with lentiviral plasmids encoding nontarget (NT) and *Rabgef1* single guide (sg) RNA and Cas9 (sgRNA NT and sgRNA *Rabgef1*, respectively) were used. **a** High-resolution confocal microscopy pictures of Rab5 (red) and DAPI (blue) staining in IECs, at steady-state and 1 h after LPS stimulation (100 ng/ml). Pictures are representative of similar results obtained in each of two experiments performed with two different batches of cells. **b** Representative Western Blots and **c** protein quantification showing the levels of EEA-1 0 and 60 min after LPS stimulation (100 ng/ml). Data are shown as mean \pm SEM, and are pooled from independent experiments performed with three separate batches of cells. *P* values were calculated using a one-way ANOVA test followed by Tukey's post hoc tests for multiple comparisons. ****P* < 0.001; ns not significant (*P* > 0.05)

Myd88 in *Rabgef1/Myd88*^{IEC-KO} mice largely prevented the colitis observed in *Rabgef1*^{IEC-KO} counterparts (Fig. 9a, b), which was

associated with a similar IEC cytokine expression profile between *Rabgef1/Myd88*^{IEC-KO} mice and littermate controls (Fig. 9c). These results support the conclusion that MYD88-dependent signaling mediates intestinal inflammation in *Rabgef1*^{IEC-KO} mice.

The commensal microorganisms that colonize the colon after birth are critical components of host physiology and immune homeostasis in healthy individuals, but can also contribute to pathological processes in a dysregulated system^{1,33,34}. IECs express a wide range of TLRs, which sense and transduce microbiota-derived signals via MYD88, except for TLR3^{4,7,31}. Since the delayed colitis of *Rabgef1*^{IEC-KO} mice was dependent on MYD88, we sought to determine the contribution of the microbiome in this context.

First, we wondered whether IEC-specific RABGEF1 depletion could induce alterations in the colon microbial composition. Therefore, we performed sequencing of bacterial 16S ribosomal RNA genes (16S rRNA-seq) to compare the composition of the microbiota found in the colon lumen of *Rabgef1*^{IEC-KO} and littermate *Rabgef1*^{fl/fl} controls at the age of 10 months. Multi-dimensional scaling and unsupervised hierarchical clustering did not reveal any genotype-dependent clustering (Fig. 10a, b), and bacterial diversity was found to be similar in the colon of *Rabgef1*^{IEC-KO} as compared to the control counterparts (Fig. 10c). In addition, colon microbiota composition was not different between *Rabgef1*^{IEC-KO} and *Rabgef1*^{fl/fl} control mice (Fig. 10d), supporting that epithelial RABGEF1 deficiency does not induce changes in the gut bacterial composition.

Second, we continuously fed 6-month-old *Rabgef1*^{IEC-KO} and littermate controls with autoclaved water with or without antibiotics (AB) for a period of 4 months, and colon histopathological scoring was performed at the end of the treatment. Notably, we found that antibiotic treatment significantly reduced the features of colitis and the histopathological score in AB-treated *Rabgef1*^{IEC-KO} mice as compared to the untreated counterparts (Fig. 10e, f), supporting the conclusion that microbiota-dependent signals are involved in the delayed colitis that develops in aged *Rabgef1*^{IEC-KO} mice.

DISCUSSION

We have identified herein a novel role for the guanine exchange factor RABGEF1 in the regulation of IEC functions and intestinal inflammation in vivo. Using mice conditionally deficient for *Rabgef1* in IECs, we have provided experimental evidence that epithelial RABGEF1 deficiency promotes development of a microbiota- and MYD88-dependent colitis with age. Such colitis was associated with an upregulation of IEC-intrinsic transcripts coding for pro-inflammatory cytokines and chemokines. Notably, however, no defects in intestinal barrier permeability, nor features of systemic immune activation, were observed in 12-month-old *Rabgef1*^{IEC-KO} mice. This supports the idea that epithelial RABGEF1 regulates events that are restricted to the gut mucosa, without substantial systemic effects. Interestingly, it has been reported in some mouse models that intestinal and systemic pathology could be regulated by distinct mechanisms and disconnected from each other.³⁵

To investigate the role of epithelial RABGEF1 in the context of intestinal inflammation, we used two distinct models of colitis, initiated either by a dysregulated host immune response (i.e., IL-10 deficiency) or by an epithelial-eroding agent (i.e., DSS). The fact that IECs from 10-week-old *Il10*^{-/-} mice or from DSS-exposed WT mice shared a strikingly similar profile supports the conclusion that the IEC response to colitogenic triggers, whether they are endogenous (i.e., IL-10 deficiency) or exogenous (i.e., DSS), is conserved. This is particularly interesting, since the IL-10 deficient and the DSS models are different in several aspects, e.g., chronic vs. acute, and endogenous immune trigger vs. exogenous trigger, respectively.

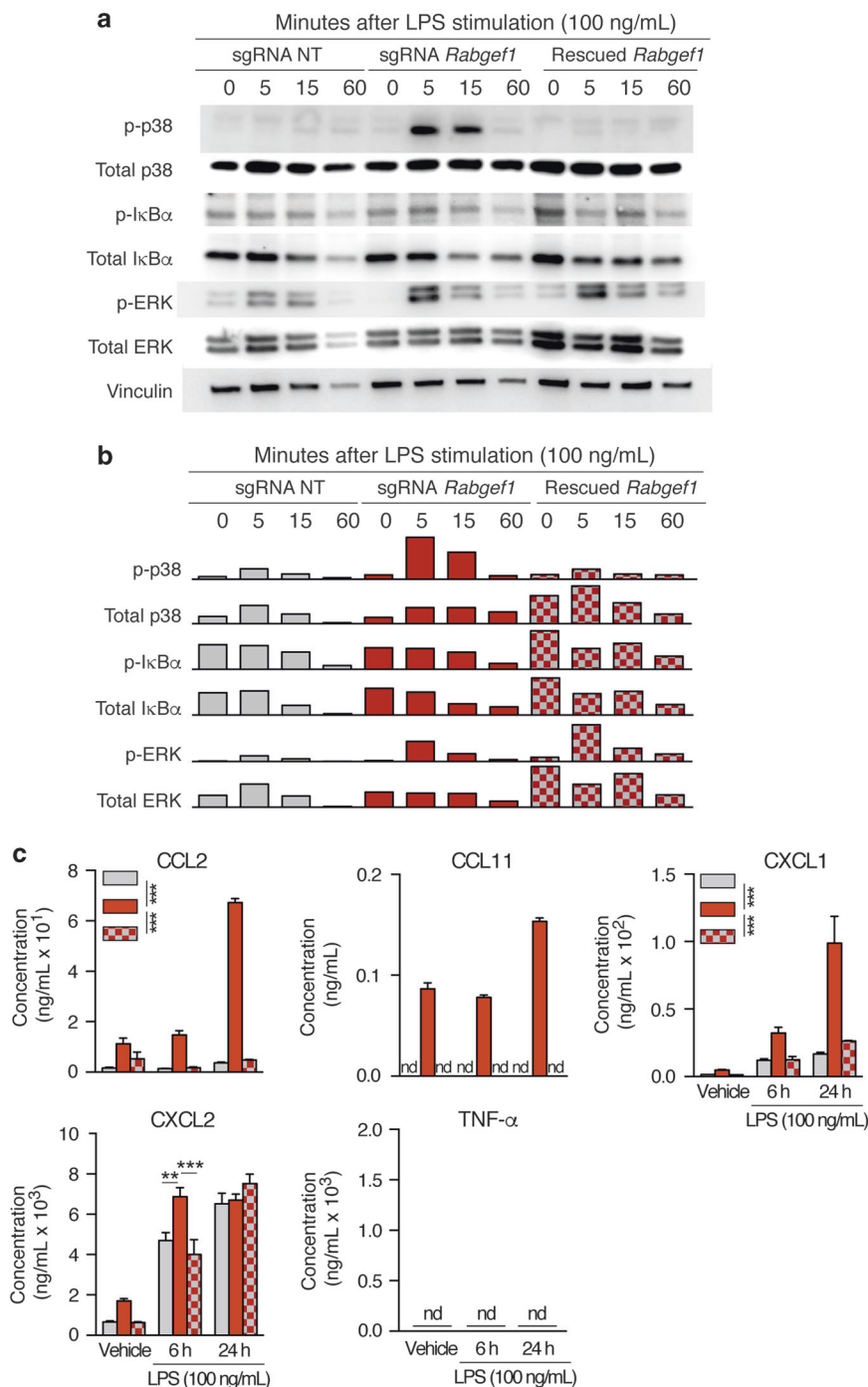


Fig. 8 RABGEF-dependent regulation of p38-dependent signaling and chemokine production in IECs. Immortalized primary mouse IECs transduced with lentiviral plasmids encoding nontarget (NT) and *Rabgef1* single guide (sg)RNA and Cas9 (sgRNA NT and sgRNA *Rabgef1*, respectively), and RABGEF1-deficient IECs (sgRNA *Rabgef1*) transduced with plasmids encoding *Rabgef1* to restore RABGEF1 expression (Rescued RABGEF1) were used. **a** Representative Western Blots and **b** protein quantification showing the levels of the indicated phospho-proteins and total proteins at different times following LPS stimulation. Results are representative of similar results obtained in each of three experiments performed with three separate batches of cells. **c** Cytokine concentrations measured by Luminex assay in the supernatants of media (Vehicle)- or LPS-stimulated IECs. Data are mean + SEM and are pooled from two independent stimulation experiments performed with two separate batches of cells. *P* values were calculated using a two-way ANOVA test followed by Tukey's post hoc tests for multiple comparisons. ***P* < 0.01; ****P* < 0.001; nd not detected

Given the differences observed in the recruitment of immune cells between the two models, it seems likely that the eroding properties of DSS and the subsequent release of damage-associated signals from dying epithelial cells initially contribute to the acute immune cell infiltration upon DSS exposure, as

opposed to the situation in IL-10-deficient mice. However, the features of DSS-induced pathology, including the cellular immune profile in the colon, are thought to be influenced by many factors, including the dose and duration of DSS treatment, the gender and genetic background of the host, and the microbial status or the

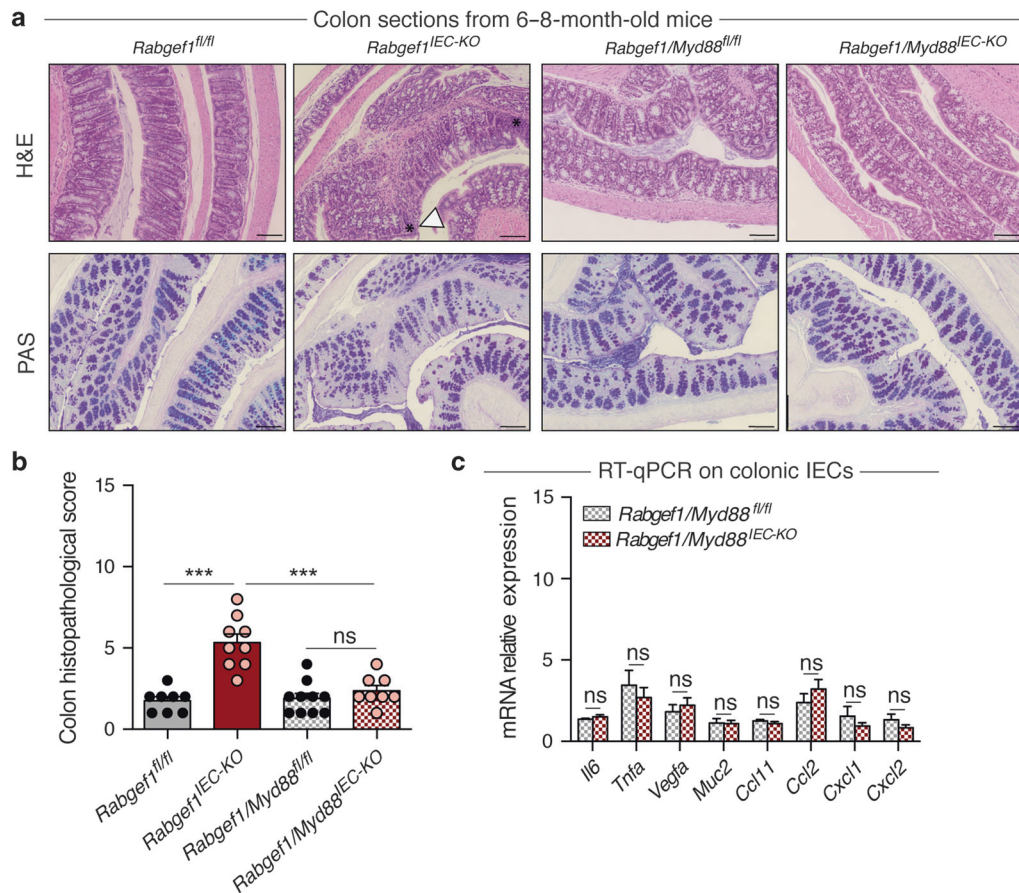


Fig. 9 Role of IEC-intrinsic MYD88 signaling in the development of intestinal inflammation in *Rabgef1^{IEC-KO}* mice. Analyses were performed on 6-to-8-month-old mice. **a** Representative H&E and PAS staining of colon sections. Asterisks indicate focal inflammatory cell infiltrates and arrowhead shows eroded epithelial areas. **b** Colon histopathological score ($n = 8–10$ mice/group). **c** IECs were isolated from *Rabgef1/Myd88^{IEC-KO}* and littermate control mice and expression of the indicated genes was assessed by RT-qPCR ($n = 4$ mice/group). **b**, **c** Data are shown as mean + SEM, as well as individual values in (**b**), and are pooled from two independent experiments. P values were calculated using a one-way (**b**) or a two-way (**c**) ANOVA with Tukey's post hoc tests. **** $P < 0.001$; ns not significant ($P > 0.05$). Scale bars: 100 μ m

housing conditions, which makes comparisons between studies difficult.^{36,37}

During either form of colitis, IEC-specific RABGEF1 deficiency exacerbated several cardinal features of colon pathology and was associated with increased expression of pro-inflammatory cytokines, but did not impact intestinal permeability and systemic levels of pro-inflammatory cytokines, supporting the existence of RABGEF1-dependent local regulatory mechanisms. Moreover, genes involved in the regulation of the endolysosomal system were found to be downregulated in IECs from *Rabgef1^{IEC-KO}* mice as compared to controls, both under the *Il10^{-/-}* and the WT background. This suggests that the GEF activity of RABGEF1 for the GTPase Rab5, critical for the biogenesis of endosomes¹⁷, mediates such effects in IECs in vivo.

The transcriptomic analyses of RABGEF1-deficient IECs also suggested a possible involvement of RABGEF1 in regulating MAPK- or NF- κ B-dependent innate signaling. Specifically, we used an in vitro tool to investigate the potential RABGEF1-dependent regulation of such pathways. Immortalized mouse primary IECs were chosen because they allow analysis of innate immune functions³⁰, but circumvent the restricted availability and homogeneity of primary cells and organoids, respectively, and also avoid the structural and functional alterations often present in intestinal cell lines. Using this model, we have shown on the one hand that RABGEF1 knockdown markedly altered Rab5-dependent endocytic events, at steady-state and upon LPS stimulation. On the other hand, we found that, upon LPS stimulation,

RABGEF1 specifically prevented activation of p38 MAPK and downregulated the production of several chemokines, including CCL2, CXCL1, and CXCL2, consistent with the transcriptomic profile of RABGEF1-deficient IECs in vivo.

Notably, RABGEF1-sufficient IECs seemed particularly hyporesponsive to LPS stimulation in our experimental setting, which reflects well the hypo-responsiveness of IECs to LPS and other TLR ligands in vivo.^{38–40} However, when IEC-intrinsic RABGEF1 expression was knocked down, LPS responsiveness was potentiated, leading to aberrant activation of the p38 MAPK and increased chemokine production. These data are consistent with the hypothesis that RABGEF1 may act as a regulator of IEC innate responsiveness in vivo, and that such responsiveness is compromised when epithelial RABGEF1 is absent, which would contribute to increased chemokine expression and the exaggerated inflammation observed in *Rabgef1^{IEC-KO}* mice. In this regard, it is interesting to note that the monocyte chemoattractant CCL2 and the neutrophil chemoattractants CXCL1 and CXCL2 are thought to be involved in human or experimental IBD,^{41–44} and the p38 MAPK pathway has been shown to specifically control the expression of chemokines within IECs.^{45,46}

The delayed development of colitis in *Rabgef1^{IEC-KO}* mice suggested that environmental factors may mediate disease susceptibility in those animals, and microbe-derived signals arguably represented appealing candidates. Indeed, *Rabgef1^{IEC-KO}* mice developed intestinal inflammation at a site of heavy microbial exposure (i.e., the colon) but did not have detectable

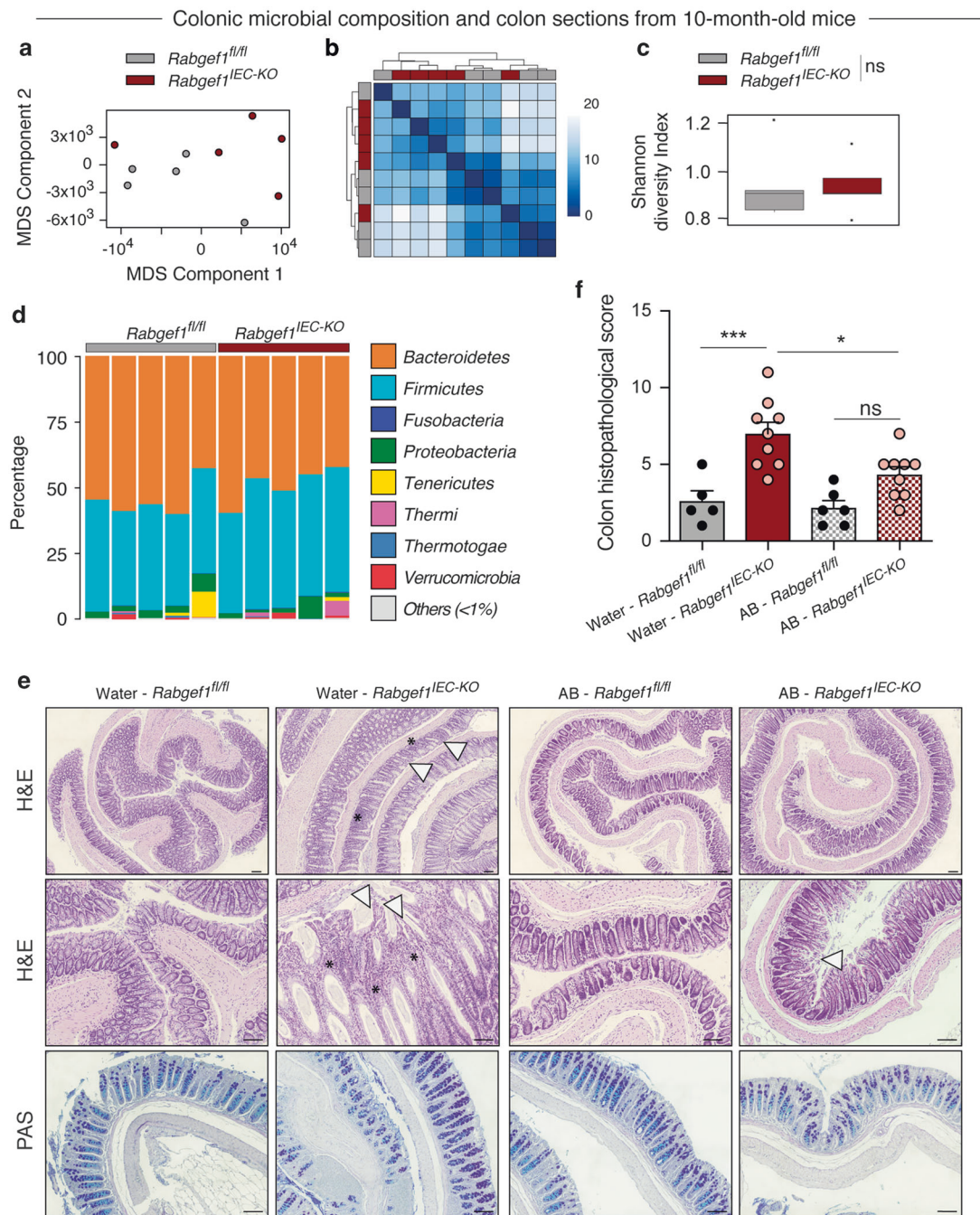


Fig. 10 Influence of the gut microbiome of *Rabgef1*^{IEC-KO} mice on the delayed development of colon pathology. **a–d** Microbial composition of colonic luminal contents in 10-month-old *Rabgef1*^{IEC-KO} and littermate control mice. 16S rRNA-seq and taxonomic comparisons were performed between *Rabgef1*^{IEC-KO} and littermate control mice ($n = 5$ mice/group) at the phylum level. **a** Multi-dimensional scaling (MDS) graphs. **b** Unsupervised hierarchical clustering of biological replicates. The color scale reflects the clustering distance (0 = highest correlation; 20 = the lowest correlation) between 16S rRNA expression patterns of two samples. **c** Shannon diversity indexes. **d** Percentage of the most represented taxa (>1%) within each individual sample, presented as stacked bars. **e** Representative H&E and PAS staining of colon sections. Stars indicate focal inflammatory cell infiltrates and arrowhead shows eroded epithelial areas. **f** Colon histopathological score ($n = 5–9$ mice/group). Data are shown as mean + SEM, as well as individual values, and are pooled from two independent experiments. P values were calculated using a one-way ANOVA with Tukey's post hoc tests. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$; ns not significant ($P > 0.05$). Scale bars: 100 μ m

pathology in the small intestine where the bacterial load is much lower. Moreover, we showed that the spontaneous colitis of *Rabgef1*^{IEC-KO} mice was MYD88-dependent, and it is well-known that many microbe-associated patterns can activate TLRs through the adapter protein MYD88^{47,48}. By analyzing the microbial composition of the colons of *Rabgef1*^{IEC-KO} mice and by treating them with AB, we have provided evidence that the intestinal

inflammation that develops in aged *Rabgef1*^{IEC-KO} mice depends on microbe-derived commensal signals. In younger mice, it may be that regulatory mechanisms are more effective in preventing development of colitis.

Previous work supports the conclusion that RABGEF1 can regulate many different pathways of innate immunity. In mast cells in vitro, RABGEF1 has been shown to regulate Fc ϵ RI-dependent activation of

Ras and ERK²⁰ and SCF-dependent activation of ERK and JNK.⁴⁹ In the skin, we have demonstrated that keratinocyte RABGEF1 can maintain skin homeostasis by regulating intrinsic IL1R-MYD88-NF- κ B-dependent signaling pathways independently of the skin microbiota.²¹ The current study indicates that epithelial RABGEF1 can also regulate microbiota- and MYD88-dependent intestinal inflammation and p38 MAPK-dependent signaling and chemokine production in IECs. We cannot exclude the possibility that IL-1 β contributes to MYD88-dependent inflammation in *Rabgef1*^{IEC-KO} mice. However, RABGEF1-dependent regulatory pathways appear to exhibit differences in functional and interactive properties in epidermal keratinocytes, IECs and mast cells, suggesting that there may be tissue- and cell-specific mechanisms mediating different RABGEF1 effects.

The precise mechanisms by which the activities of RABGEF1 regulate the activation of innate immune pathways, and the expression of cytokines, in IECs are still unclear. Nevertheless, our data are in accord with the hypothesis that the GEF activity for Rab5 may contribute to these effects. Indeed, we have demonstrated that deletion of RABGEF1 can markedly alter Rab5-dependent endocytic events, as well as TLR4-MYD88-dependent signaling pathways, in IECs. Since activation of TLR4 by LPS is regulated by endosomal-mediated endocytosis, which requires Rab5 activity that is regulated by RABGEF1^{13–17,48}, RABGEF1 deficiency may downregulate LPS-induced receptor-mediated endocytosis. Because RABGEF1 represents an important negative regulator of TLR4 signaling, RABGEF1 deficiency may promote the increased activation of LPS-dependent pathways, resulting in an increased cytokine expression in IECs.

Stimulation of the TLR4-MYD88-dependent pathway by LPS also can activate several transcription factors, including NF- κ B, AP-1, and CREB^{31,48}. In our signal transduction analyses, we showed that stimulation of RABGEF1-deficient IECs with LPS did not increase levels of p-IkB α , suggesting that the NF- κ B pathway is not involved in the observed effect elicited by RABGEF1 deficiency. Similarly, our signaling studies also showed that ERK MAPK was not involved in the LPS-induced effect observed with these cells, suggesting that the AP-1 pathway is likewise not directly involved. However, levels of phosphorylation of p38 MAPK were significantly enhanced by LPS stimulation in RABGEF1-deficient IECs, suggesting that the CREB transcription factor pathway is involved in mediating the cytokine transcription effects during the TLR4-dependent activation of IECs^{31,48}. Obviously, future detailed mechanistic studies using epidermal keratinocytes, mast cells and IECs expressing different RABGEF1 domain mutants will help in investigating how different domains of RABGEF1 are involved in such effects and the precise molecular mechanisms underlying the regulatory functions of RABGEF1.

In conclusion, our study identifies a previously unknown function for RABGEF1 protein in the regulation of MYD88-dependent intestinal inflammation and IEC innate pathways in mice. It is currently unknown whether dysregulated epithelial RABGEF1 expression also contributes to intestinal pathology in IBD in humans. However, in 2013, Montero-Meléndez and colleagues performed microarray gene expression profiling of colon biopsies from a small cohort of IBD patients in search of predictive genomic signatures, and identified *RABGEF1* transcript level as a clinically relevant predictor for classifying IBD patients, with glucocorticoid-resistant patients exhibiting the lowest RABGEF1 expression.⁵⁰ Together with our study, these data suggest that RABGEF1-dependent regulatory mechanisms may represent promising therapeutic targets in the context of IBD.

METHODS

Mice

C57BL/6 *Rabgef1*^{fl/fl} mice were previously described.²¹ Transgenic C57BL/6 *Villin-Cre* (B6.Cg-Tg(Vil1-cre)997Gum/J),⁵¹ *Il10*^{-/-}

(B6.129P2-*Il10*^{tm1Cgn/J}) and *Myd88*^{fl/fl} (B6.129P2[SJL]-*Myd88*^{tm1-Defr/J}) mice were from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA). Mice were housed under specific pathogen free (SPF) conditions and maintained in a 12-h light–dark cycle with food and water ad libitum. Age-matched littermate mice were used for experiments throughout the study. All animal experiments described in this study were carried out with the approval of the Institutional Animal Care and Use Committee of Liege University. The “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”, prepared by the Institute of Laboratory Animal Resources, National Research Council, and published by the National Academy Press, as well as European and local legislations, were followed carefully.

Reagents and antibodies

Details about reagents and antibodies can be found in the Supplementary material.

Immunostaining and confocal microscopy

Paraffin-embedded intestinal sections were deparaffinized, rehydrated, and heat-induced epitope retrieval was performed in sodium citrate buffer. After blocking, samples were incubated overnight at 4°C with primary antibodies. Secondary antibody staining was performed at room temperature.

For immunostaining of IECs in vitro, IECs were cultured on slides for 24 h. Slides were methanol-fixed and permeabilized before staining with primary and secondary antibodies.

Images were acquired using a Leica SP5 (Wetzlar, Germany) confocal laser-scanning microscope. Additional Details can be found in the Supplementary material.

Assessment of intestinal permeability

To evaluate intestinal permeability, FITC-dextran (FD4, Merck, Darmstadt, Germany) was administered by gastric gavage to fasting mice (4 h food and water fasting, 0.6 mg/g diluted in phosphate-buffered saline (PBS)). Four hours later, plasma was collected and plasma levels of FITC were measured by spectrophotometry.

Quantitative RT-PCR on IECs

After IEC FACS sorting, RNA was extracted and reverse-transcribed into cDNA, and PCR reactions were performed in duplicate. Primer sequences can be found in Supplementary Table 3. Data were normalized to the housekeeping genes *Hprt* and *Ppib* in the same sample. Additional details can be found in the Supplementary material.

Quantification of serum cytokines

Blood was collected from the tail vein and sera were assayed for CXCL1, CXCL2, GM-CSF, IL1- β , IL-6, VEGF, and TNF- α using Luminex Mouse Magnetic Assay (R&D, Minneapolis, USA), according to the manufacturer's recommendations.

Colon histopathological scoring

For evaluation of colon pathology in antibiotic-treated or untreated *Rabgef1*^{IEC-KO}, *Rabgef1*/*Myd88*^{IEC-KO} and control counterparts at steady-state, on the WT or *Il10*^{-/-} background, the scoring system described in the report of Dieleman et al.⁵² was adapted as described in the Supplementary material.

Mouse model of DSS-induced colitis

Experiments involving DSS exposure involved between 8- and 12-week-old female mice. Acute colitis was induced by addition of 3% DSS (DSS Colitis grade, MP biomedical, Santa Ana, USA) to the drinking water for 7 days. Stool consistency was evaluated at day 7 during 4 h and mice were then sacrificed to perform a macroscopic evaluation of the colons and for histopathological analyses. The severity of DSS-induced colitis was evaluated, as



previously reported⁵³ and as described in the Supplementary material.

In vitro IEC culture and stimulation

Mouse CI-muINTEPI cells (InSCREENeX, Braunschweig, Germany) were cultured in muINTEPI complete medium (InSCREENeX). Plates were precoated with collagen solution (InSCREENeX) for 2 h and washed with PBS before use. When cultured cells reached 80% confluence, NT control, RABGEF1-knockdown and RABGEF1-rescued IECs were seeded in 24-well plates (4×10^5 cells). For confocal microscopy analysis, cells were cultured and stimulated as described above. For Western blot studies, cells were stimulated with LPS (100 ng/ml) for 5, 15, or 60 min; for cytokine measurements, cells were stimulated with LPS for 6 or 24 h and cell culture supernatants were assayed for CCL2, CCL11, CXCL1, CXCL2, and TNF- α using Luminex Mouse Magnetic Assay (R&D, Minneapolis, USA).

Western blotting

Mouse IECs were lysed in lysis Buffer (3.03 g TRIS pH 7.5 + 0.19 g EDTA + 5 mL NP-40 + 6 g NaCl in 500 mL DQ water) supplemented with Complete™ Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Basel, Switzerland) and PhosSTOP™ Phosphatase Inhibitor Cocktail (Roche, Basel, Switzerland). Protein concentrations in the resulting lysates were measured using the Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA). Totally, 50 μ g proteins were loaded in 4–20% Mini-PROTEAN® TGX™ Gel (Bio-rad, Hercules, USA) and electroblotted onto Invitrolon polyvinylidene fluoride membranes (Novex, ThermoFisher Scientific, Waltham, USA). Membranes were blocked in 5% nonfat dry milk in Tris-buffered saline-Tween 20 (0.1%) buffer and then probed with primary antibodies in 5% bovine serum albumin-tris-buffered saline-Tween 20 (0.1%) buffer. Equal loading was confirmed by probing for actin, vinculin or HSP-90 α .

Antibiotic treatment

Six-month-old *Rabgef1*^{IEC-KO} mice and *Rabgef1*^{fl/fl} littermate controls were fed autoclaved water with or without enrofloxacin 1% (Baytril, Bayer) for 4 months.

Other methods

See the Methods section in Supplementary material for cell isolation, staining and flow cytometry, assessment of *Rabgef1* deletion by quantitative PCR, sample preparation and histology, high-throughput mRNA-sequencing, GSEA, lentiviral-based RABGEF1 knock down and rescuing of mouse IECs, 16S rRNA gene sequencing and metagenomic analyses.

Statistical analyses

Respect of the assumptions of normal distribution of residuals and homoscedasticity were verified. Unless otherwise indicated, data are presented as mean + SEM, as well as individual values, from independent experiments and were pooled for analysis in each data panel. Statistical analyses were performed using Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, USA), except for RNA-seq data, for which the R package “DESeq2” was used. We performed the Mantel-Cox test, one-way or two-way ANOVA with Tukey’s post hoc tests for multiple comparisons, and Mann–Whitney or unpaired two-tailed Student’s *t* tests as mentioned in the respective figure legends. We considered a *P* value lower than 0.05 as significant. **P* < 0.05; ***P* < 0.01, ****P* < 0.001; ns not significant.

DATA AVAILABILITY

The RNA-seq data provided in this manuscript have been deposited in the ArrayExpress database at EMBL-EBI (<https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/experiments/E-MTAB-7315>) under accession number E-MTAB-7315.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank all members of the Laboratories of Cellular and Molecular Immunology and Immunophysiology for discussions; Sandra Ormenese, Raafat Stefan, Alexandre Hego, and Jean-Jacques Goval from the GIGA Flow Cytometry and Cell Imaging Platform; Pierre Drion, Gaëlle Lambert and all staff members from the GIGA Mouse facility and Transgenics Platform; Cécile Oury for discussions about colitis induction protocols; Chantal Humblet and staff members from the Immunohistology Platform; Benoît Charlotiaux, Manon Deckers, Latifa Karim, and members from the Genomics Platform; Pauline Maréchal, Cedric François, Raja Fares, and Ilham Sbair for their excellent technical and administrative support. The Cellular and Molecular Immunology Laboratory is supported by an Excellence Of Science (EOS) program from the F.R.S.-FNRS and FWO. S.J.G., M.T. and S.-Y.T. are supported by National Institutes of Health grant NIH/NIAMS R01 AR067145. F.B. is supported by the F.R.S.-FNRS for the FRFS-WELBIO under grant CR-2012S-01R. T.M. is a Research Associate of the F.R.S.-FNRS and is supported by an “Incentive Grant for Scientific Research” of the F.R.S.-FNRS (F.4508.18), by the FRFS-WELBIO under grant CR-2017s-04, by the Acteria Foundation and by an ERC Starting Grant (ERC-StG-2018 IM-ID 801823).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

T.M. conceived of the project. S.E.A., C.R., D.P., M.-A.M., T.A., C.J.D., E.L., S.-Y.T., M.T., F.B., S.J.G. and T.M. were involved in experimental design. S.E.A. and C.R. performed most of the experiments and analyzed the data, and compiled the data with the help of T.M. C.B., J.S., M.M. and M.-A.M. helped with experiments. Q.B., D.P. and T.M. performed the bioinformatic analyses with the support of the GIGA Genomics Platform. S.-Y.T., M.T. and S.J.G. provided *Rabgef1*^{fl/fl} mice. S.E.A. and T.M. prepared the figures. T.M. secured funding and wrote the original paper. All authors participated in writing or editing the paper.

ADDITIONAL INFORMATION

The online version of this article (<https://doi.org/10.1038/s41385-019-0211-z>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Competing interests: The authors declare no competing interests.

Ethics statement: All animal experiments described in this study were carried out with the approval of the Institutional Animal Care and Use Committee of Liege University (DE1626). The “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”, prepared by the Institute of Laboratory Animal Resources, National Research Council, and published by the National Academy Press, as well as European and local legislations, were followed carefully.

Publisher’s note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

REFERENCES

1. Kaiko, G. E. & Stappenbeck, T. S. Host-microbe interactions shaping the gastrointestinal environment. *Trends Immunol.* **35**, 538–548 (2014).
2. Peterson, L. W. & Artis, D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 141–153 (2014).
3. Okumura, R. & Takeda, K. Roles of intestinal epithelial cells in the maintenance of gut homeostasis. *Exp. Mol. Med.* **49**, e338 (2017).
4. McClure, R. & Massari, P. TLR-dependent human mucosal epithelial cell responses to microbial pathogens. *Front. Immunol.* **5**, 386 (2014).
5. Pastorelli, L., De Salvo, C., Mercado, J. R., Vecchi, M. & Pizarro, T. T. Central role of the gut epithelial barrier in the pathogenesis of chronic intestinal inflammation: lessons learned from animal models and human genetics. *Front. Immunol.* **4**, 280 (2013).
6. Gallo, R. L. & Hooper, L. V. Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 503–516 (2012).
7. Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S. & Medzhitov, R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* **118**, 229–241 (2004).
8. Podolsky, D. K. Inflammatory bowel disease. *N. Engl. J. Med.* **347**, 417–429 (2002).
9. Strober, W., Fuss, I. & Mannon, P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J. Clin. Invest.* **117**, 514–521 (2007).
10. Jostins, L. et al. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* **491**, 119–124 (2012).
11. Hooper, L. V. & Gordon, J. I. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* **292**, 1115–1118 (2001).
12. Ni, J., Wu, G. D., Albenberg, L. & Tomov, V. T. Gut microbiota and IBD: causation or correlation? *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **14**, 573 (2017).

13. Delprato, A., Merithew, E. & Lambright, D. G. Structure, exchange determinants, and family-wide rab specificity of the tandem helical bundle and Vps9 domains of Rabex-5. *Cell* **118**, 607–617 (2004).
14. Horiuchi, H. et al. A novel Rab5 GDP/GTP exchange factor complexed to Rabaptin-5 links nucleotide exchange to effector recruitment and function. *Cell* **90**, 1149–1159 (1997).
15. Zerial, M. & McBride, H. Rab proteins as membrane organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 107–117 (2001).
16. Mattera, R. & Bonifacino, J. S. Ubiquitin binding and conjugation regulate the recruitment of Rabex-5 to early endosomes. *EMBO J.* **27**, 2484–2494 (2008).
17. Zeigerer, A. et al. Rab5 is necessary for the biogenesis of the endolysosomal system in vivo. *Nature* **485**, 465–470 (2012).
18. Lee, S. et al. Structural basis for ubiquitin recognition and autoubiquitination by Rabex-5. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 264–271 (2006).
19. Mattera, R., Tsai, Y. C., Weissman, A. M. & Bonifacino, J. S. The Rab5 guanine nucleotide exchange factor Rabex-5 binds ubiquitin (Ub) and functions as a Ub ligase through an atypical Ub-interacting motif and a zinc finger domain. *J. Biol. Chem.* **281**, 6874–6883 (2006).
20. Tam, S. Y. et al. RabGEF1 is a negative regulator of mast cell activation and skin inflammation. *Nat. Immunol.* **5**, 844–852 (2004).
21. Marichal, T. et al. Guanine nucleotide exchange factor RABGEF1 regulates keratinocyte-intrinsic signaling to maintain skin homeostasis. *J. Clin. Invest.* **126**, 4497–4515 (2016).
22. Kuhn, R., Lohler, J., Rennick, D., Rajewsky, K. & Muller, W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* **75**, 263–274 (1993).
23. Barnett, M. P. et al. Changes in colon gene expression associated with increased colon inflammation in interleukin-10 gene-deficient mice inoculated with *Enterococcus* species. *BMC Immunol.* **11**, 39 (2010).
24. Hansen, J. J., Holt, L. & Sartor, R. B. Gene expression patterns in experimental colitis in IL-10 deficient mice. *Inflamm. Bowel Dis.* **15**, 890 (2009).
25. Russ, A. E. et al. Gene expression changes in the colon epithelium are similar to those of intact colon during late inflammation in interleukin-10 gene deficient mice. *PLoS ONE* **8**, e63251 (2013).
26. Keubler, L. M., Buettner, M., Hager, C. & Bleich, A. A Multihit Model: colitis lessons from the interleukin-10-deficient mouse. *Inflamm. Bowel Dis.* **21**, 1967–1975 (2015).
27. Paul, G., Khare, V. & Gasche, C. Inflamed gut mucosa: downstream of interleukin-10. *Eur. J. Clin. Invest.* **42**, 95–109 (2012).
28. Yan, Y. et al. Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate induced colitis. *PLoS One* **4**, e6073 (2009).
29. Kim, E. et al. MouseNetv2: a database of gene networks for studying the laboratory mouse and eight other model vertebrates. *Nucleic Acids Res.* **44**, D848–D854 (2016).
30. Schwerk, J. et al. Generation of mouse small intestinal epithelial cell lines that allow the analysis of specific innate immune functions. *PLoS ONE* **8**, e72700 (2013).
31. Kondo, T., Kawai, T. & Akira, S. Dissecting negative regulation of Toll-like receptor signaling. *Trends Immunol.* **33**, 449–458 (2012).
32. O'Neill, L. A. & Bowie, A. G. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 353–364 (2007).
33. Kamada, N., Seo, S. U., Chen, G. Y. & Nunez, G. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 321–335 (2013).
34. Dethlefsen, L., McFall-Ngai, M. & Relman, D. A. An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. *Nature* **449**, 811–818 (2007).
35. Uhlig, H. H. et al. Differential activity of IL-12 and IL-23 in mucosal and systemic innate immune pathology. *Immunity* **25**, 309–318 (2006).
36. Nunes, N. S. et al. Temporal clinical, proteomic, histological and cellular immune responses of dextran sulfate sodium-induced acute colitis. *World J. Gastroenterol.* **24**, 4341–4355 (2018).
37. Eichele, D. D. & Kharbanda, K. K. Dextran sodium sulfate colitis murine model: An indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis. *World J. Gastroenterol.* **23**, 6016–6029 (2017).
38. Lotz, M. et al. Postnatal acquisition of endotoxin tolerance in intestinal epithelial cells. *J. Exp. Med.* **203**, 973–984 (2006).
39. Otte, J. M., Cario, E. & Podolsky, D. K. Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells. *Gastroenterol.* **126**, 1054–1070 (2004).
40. Rhee, S. H. et al. Pathophysiological role of Toll-like receptor 5 engagement by bacterial flagellin in colonic inflammation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **102**, 13610–13615 (2005).
41. Alkim, C., Alkim, H., Koksall, A. R., Boga, S. & Sen, I. Angiogenesis in inflammatory bowel disease. *Int J. Inflamm.* **2015**, 970890 (2015).
42. Danese, S. & Gasbarrini, A. Chemokines in inflammatory bowel disease. *J. Clin. Pathol.* **58**, 1025–1027 (2005).
43. Wang, D., Dubois, R. N. & Richmond, A. The role of chemokines in intestinal inflammation and cancer. *Curr. Opin. Pharm.* **9**, 688–696 (2009).
44. Shea-Donohue, T. et al. Mice deficient in the CXCR2 ligand, CXCL1 (KC/GRO- α), exhibit increased susceptibility to dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis. *Innate Immun.* **14**, 117–124 (2008).
45. Parhar, K., Ray, A., Steinbrecher, U., Nelson, C. & Salh, B. The p38 mitogen-activated protein kinase regulates interleukin-1 β -induced IL-8 expression via an effect on the IL-8 promoter in intestinal epithelial cells. *Immunology* **108**, 502–512 (2003).
46. Waterhouse, C. C., Joseph, R. R., Winsor, G. L., Lacombe, T. A. & Stadnyk, A. W. Monocyte chemoattractant protein-1 production by intestinal epithelial cells in vitro: a role for p38 in epithelial chemokine expression. *J. Interferon Cytokine Res.* **21**, 223–230 (2001).
47. Kawai, T. & Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* **11**, 373–384 (2010).
48. Gay, N. J., Symmons, M. F., Gangloff, M. & Bryant, C. E. Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 546–558 (2014).
49. Kalesnikoff, J. et al. RabGEF1 regulates stem cell factor/c-Kit-mediated signaling events and biological responses in mast cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **103**, 2659–2664 (2006).
50. Montero-Melendez, T., Llor, X., Garcia-Planella, E., Perretti, M. & Suarez, A. Identification of novel predictor classifiers for inflammatory bowel disease by gene expression profiling. *PLoS ONE* **8**, e76235 (2013).
51. Madison, B. B. et al. Cis elements of the villin gene control expression in restricted domains of the vertical (crypt) and horizontal (duodenum, cecum) axes of the intestine. *J. Biol. Chem.* **277**, 33275–33283 (2002).
52. Dieleman, L. A. et al. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clin. Exp. Immunol.* **114**, 385–391 (1998).
53. Erben, U. et al. A guide to histomorphological evaluation of intestinal inflammation in mouse models. *Int J. Clin. Exp. Pathol.* **7**, 4557–4576 (2014).

